Microbiología Española

VOL. III

N.º 2

MCML

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
28 MAR

SUMARIO

Páginas

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Investigación de nuevos agentes quimioterápicos, por **Selman A. Waksman** 83

Bacterias y mohos procedentes de cultivos de folículos tracomatosos, por **A. Socías** 99

Ensayo microbiológico de la vitamina B_{12} con el *L. leichmannii*.—Influencia del pH y temperatura en su estabilidad, por **R. Préstamo** 117

Posibilidad de fabricar levaduras prensadas sobre prehidrolizados de residuos agrícolas, por **Juan Marcilla Arrazola** y **Luis Hidalgo Fernández-Cano** 125

INFORMACION

Estancia del profesor Waksman 131

Discurso del profesor Socías 133

Discurso del profesor Waksman 140

Sir Howard Walter Florey 141

El profesor Penso, en la Sociedad 142

Nueva colección de bacterias de interés industrial 142

Actas de la Sociedad 144

BIBLIOGRAFIA

Indice de artículos de Revistas 145

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON DÉSIRE L'ÉCHANGE
MAN BITTET DEN WECHSEL
WE BEG THE CHANGE

TODA LA CORRESPONDENCIA DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

Microbiología Española

VOL. III

N.º 2

MCML

GRAFICAS TEJARIO, S. A. Plaza del Biombo, 4. Teléfono 22 12 88. MADRID

INVESTIGACION DE NUEVOS AGENTES QUIMIOTERAPICOS (*)

Selman A. Waksman.

Quisiera presentarles los métodos y procedimientos que han sido establecidos para el estudio de la formación, aislamiento, propiedades y utilización para fines quimioterápicos de los antibióticos, o sustancias producidas por microorganismos y que tienen la capacidad, en disoluciones diluídas, de inhibir el crecimiento e incluso de matar a otros microbios.

¿Cómo se descubren los organismos que son capaces de producir antibióticos que el clínico puede utilizar para combatir a diversas enfermedades contagiosas? Se conocen al presente dos caminos a la Quimioterapia, o mejor dicho, dos procedimientos generales para el descubrimiento de nuevos agentes quimioterápicos.

Uno de ellos es la síntesis de productos activos realizada por el químico, y pondré como ejemplo las investigaciones brillantes de Ehrlich, quien descubrió las potencialidades del salvarsán y otros productos arsenicales utilizados principalmente para combatir enfermedades producidas por espiroquetas y protozoos; y más recientemente, el descubrimiento del grupo variado de sulfonamidas utilizadas para el tratamiento de cierto número de infecciones bacterianas.

El segundo procedimiento es el del microbiólogo. Primeramente, los biólogos o los naturalistas se enteraron por sus propias observaciones o a través de la experiencia popular de la eficacia de ciertos productos de origen vegetal, como, por ejemplo, la quinina, para combatir ciertas infecciones y hoy día el microbiólogo ha entrado de lleno en esta investigación en el nuevo campo de los antibióticos.

¿Qué son los antibióticos? Antes de describirles el camino que sigue el microbiólogo en el descubrimiento de nuevas sustancias antimicrobianas, que pudieran ser utilizadas como agentes quimioterápicos, deseo primeramente definir los antibióticos, para describir sus propiedades y para indicar en qué se diferencian de los antisépticos y desinfectantes corrientes.

(*) Conferencia pronunciada el 18 de abril de 1950 en la SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES. Traducción de F. Bustinza.

Los antibióticos son altamente selectivos en su acción sobre diversas bacterias, hongos y virus. Esta selectividad se extiende no solamente a los géneros o especies, sino incluso a ciertas estirpes bacterianas. Algunos antibióticos son capaces de atacar ampliamente a las bacterias Gram positivas y solamente en extensión limitada, a las formas Gram negativas, en tanto que otros antibióticos actúan de igual modo sobre grupos determinados de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Algunos antibióticos no tienen influencia sobre los hongos, otros atacan a hongos y bacterias, en tanto que otros actúan únicamente sobre hongos. Algunos son activos frente a Rickettsias y algunos pocos atacan a los virus de mayor tamaño. Algunos poseen actividad antiprotozoo y anti-Trichomonas. No se conocen todavía antibióticos que sean activos frente a los virus de menor tamaño, aunque existen indicaciones de que pueden ser descubiertos y ello es solamente cuestión de tiempo. Estas variaciones en la actividad antimicrobiana de los diversos antibióticos sobre diferentes microorganismos, no solamente son de índole cualitativa, sino también cuantitativa. Podemos, pues, hablar del espectro antibiótico, o sea, de la acción selectiva de un determinado antibiótico sobre determinadas bacterias y otros microorganismos.

La segunda propiedad más importante de los antibióticos es el hecho de que no representan un único compuesto químico, pues, en realidad, se trata de un grupo muy variado de compuestos, desde sustancias relativamente sencillas que contienen solamente carbono, hidrógeno y oxígeno, a otras más complejas que contienen también nitrógeno, azufre, e incluso cloro. Los antibióticos también varían grandemente en su estructura química. Algunos antibióticos no son simples entidades químicas, sino que están formados por grupos de compuestos que pueden diferir solamente en ciertas pequeñas variaciones en su estructura química y actividad antibacteriana; tal es el caso en el grupo de las penicilinas.

Algunos microorganismos son capaces de producir más de un antibiótico. Esto ha sido demostrado hace ya mucho tiempo en la bacteria Pseudomonas aeruginosa, que forma no solamente piocianasa y piocianina, sino también otros compuestos del grupo de los pyo, ácido piolípico y otros.

El moho Aspergillus flavus elabora ácido aspergílico y penicilina. Las estirpes de Streptomyces griseus productoras de estreptomicina elaboran también manósido-estreptomicina, actidiona y estreptocina, en tanto que otras estirpes de ese mismo organismo pueden elaborar otros antibióticos e incluso pueden ser incapaces de elaborar antibióticos. Las especies productoras de estreptomicina originan, en determinadas condiciones, mutaciones que poseen potencialidades antibióticas diferentes de los cultivos madres. El Streptomyces fradiae produce neomicina, sustancia que es activa frente a bacterias y actinomicetos e inactiva frente a los hongos, y fradicina, que es activa únicamente frente a los hongos. El rendimiento en

un determinado antibiótico puede variar desde meros indicios a centenares de unidades por cada c. c. de medio de cultivo, y ello depende de la estirpe del organismo, composición del medio y condiciones en que se haya efectuado el crecimiento.

Creo que la información que les he dado es suficiente para deducir que la producción de antibióticos por ciertos microorganismos es una propiedad que puede cambiar no sólo cualitativamente, sino también cuantitativamente. Por otra parte, un mismo antibiótico puede ser producido por diferentes microorganismos. La penicilina es elaborada no solamente por el Penicillium notatum, sino también por el Aspergillus flavus y por algunos otros hongos. Lo mismo ocurre con respecto a la producción de estreptomicina, clavacina y otros varios antibióticos. Debido a esta propiedad, y como el antibiótico es frecuentemente designado con un nombre relacionado con el del organismo que le produce, ocurre que muchas veces se han dado varios nombres para la misma sustancia. Así, a la clavacina se le han dado cinco nombres diferentes.

Algunos antibióticos, tales como la penicilina, son destruídos rápidamente por varios microorganismos, en tanto que otros, tales como la estreptomicina, son altamente resistentes al ataque microbiano. El modo de acción de los antibióticos sobre las bacterias también difiere, pues algunos interfieren con la multiplicación celular; otros con la respiración celular o con otros mecanismos enzimáticos. El futuro de la quimioterapia depende de un conocimiento correcto de la acción de los antibióticos sobre las bacterias para que podamos aprender a imitar dicho efecto sintetizando compuestos químicos adecuados que posean las mismas o similares propiedades.

Los antibióticos varían grandemente en su toxicidad con respecto a los animales; algunos, como la penicilina, son sólo ligeramente tóxicos. Otros revelan efectos tóxicos limitados; la estreptomicina, por ejemplo, causa un ligero trastorno vestibular en algunos de los enfermos. Otros antibióticos, como la actinomicina, son altamente tóxicos. Algunos antibióticos pueden ser modificados químicamente para reducir sus propiedades tóxicas. Un derivado de la estreptomicina ha sido obtenido y se conoce con el nombre de dihidroestreptomicina y es menos tóxico para el organismo animal.

Las bacterias sensibles a un determinado antibiótico pueden gradualmente desarrollar resistencia cuando se las deja estar en contacto con él durante cierto tiempo. Los diferentes antibióticos muestran marcada diferencia en este aspecto. Algunos, como la estreptomicina, permiten el rápido desarrollo de resistencia en las bacterias sensibles. Otros, tales como la penicilina, permiten solamente un desarrollo gradual de resistencia en muy pocas bacterias sensibles. El proceso de readquisición de la sensibilidad o pérdida de la resistencia difiere no solamente con el antibiótico, sino también con la bacteria.

Estas propiedades de los antibióticos sugieren que variarán grandemente

como agentes quimioterápicos potenciales. Esta es la principal razón del porqué de más de cien antibióticos que han sido aislados durante los últimos diez años únicamente cinco o seis han hallado aplicación práctica en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas.

¿Cómo podría proceder un microbiólogo para aislar una sustancia antibiótica y para establecer sus propiedades quimioterápicas? Quisiera conducirles a través del laboratorio para irles informando de las varias etapas en el aislamiento de un antibiótico.

Comencemos con el suelo, que no es una masa muerta de residuos inertes, sino que está lleno de vida. En ella podemos reconocer filamentos de hongos actinomicetos rodeando las partículas del suelo. Puesto que trataré con cierta extensión de los actinomicetos, es esencial consignar que estos organismos crecen abundantemente en el suelo, formando del 10 al 50 por 100 de todos los microbios capaces de desarrollarse en las placas con agar.

En el proceso de aislamiento de una sustancia antibiótica, existen, al menos, ocho o diez diferentes etapas. Primero se siembra el suelo. Se aislan diversas colonias y se cultivan en medios nutritivos adecuados. Los organismos así aislados se ensayan para investigar sus propiedades antimicrobianas. Hay que descubrir los medios de cultivo líquidos adecuados para el crecimiento de dichos organismos. Los filtrados de esos cultivos se ensayan para investigar la presencia de antibióticos.

Hay que averiguar los métodos para separar las sustancias activas de los medios de cultivo y luego concentrarlas y purificarlas.

Ya aisladas las sustancias, se determina si son idénticas al material activo presente en el cultivo original. Los preparados aislados se estudian desde el punto de vista de su toxicidad y de su actividad en la experimentación animal y, finalmente, por sus aplicaciones clínicas.

Estos procedimientos varían mucho y dependen de los sustratos de los que los organismos productores de antibióticos son a i s l a d o s , la naturaleza del antibiótico producido y los recursos y el personal con que cuente el laboratorio. Frecuentemente, un cambio en el método de crecimiento de un determinado organismo puede determinar cambios en los métodos de operación. La penicilina se preparó primeramente por el método del cultivo en superficie en botellas y frascos; más adelante se introdujo el método llamado del cultivo sumergido. También debo mencionar las grandes posibilidades para mejorar el rendimiento de un antibiótico por selección de las estirpes, por cambios en la composición de los medios de cultivo y por mejora en las condiciones del crecimiento. Puesto que los diferentes antibióticos varían en sus propiedades químicas, los métodos para su aislamiento varían también grandemente. El material activo puede ser absorbido sobre carbón o sobre otros absorbentes, para luego remover con alcohol acidificado o mediante un disolvente orgánico. Otros se extraen directamente de los medios mediante disolvente.

La producción y el aislamiento de los antibióticos comprende la colaboración del microbiólogo, del químico, del farmacólogo, del fisiólogo, y, finalmente, del fabricante. La colaboración del químico es también necesaria para establecer sus propiedades quimioterápicas. El microbiólogo puede comenzar ensayando la actividad de millares de organismos. El químico puede llegar al aislamiento final de una docena de sustancias. El farmacólogo puede aprobar como útiles solamente una o dos que pasen finalmente a la estimación clínica.

Es decir, que antes de que un producto se coloque en las manos del investigador clínico ha habido que realizar un considerable volumen de investigación, para seleccionar, comparar y ensayar.

Realmente, cualquier microbiólogo, y muy especialmente el especialista en bacteriología del suelo y el fitopatólogo, han observado frecuentemente el hecho de que ciertas colonias que se desarrollan sobre agar nutritivo en placas, se rodean en ciertos casos de zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano sobre la placa. La gran importancia de este fenómeno no fué, sin embargo, reconocida, pues se consideraba que era debido a envejecimiento del medio o a la liberación de algún principio letal o cosa similar. Estas observaciones fueron pronto olvidadas, al menos en lo que se refiere a su significado potencial práctico.

Sin embargo, se fué apreciando gradualmente que se trataba, en estos casos, de un principio fundamental en microbiología. Este es el caso, especialmente en lo relacionado con la observación de Fleming en 1928, de la producción de un agente antibacteriano por un hongo verde, posteriormente identificado como *Penicillium notatum*. A dicho agente, el investigador británico designó con el nombre de penicilina.

Sin revisar el desarrollo histórico de nuestro concepto presente de antibióticos, señalaré algunos de los procedimientos que actualmente se utilizan en el aislamiento de los antibióticos. Una placa con agar se inocula con una suspensión de bacterias, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, y antes de que el agar inoculado se solidifique, se le adiciona una suspensión diluída de tierra. Esta placa se incuba a 28°. Ciertos organismos del suelo crecen y producen alrededor de sus colonias zonas claras en las que el crecimiento del estafilococo ha sido inhibido. Esos organismos producen antibióticos activos sobre la bacteria ensayada. Sin embargo, muchos de los organismos del suelo no producen a su alrededor esas zonas de inhibición. Algunos de los que las producen son hongos, otros son actinomicetos y otros son bacterias. De esas colonias se toma material y se siembra en estría sobre placas con agar. Se permite que estas resiembras crezcan durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas y luego se siembran en estría diversas bacterias en dirección perpendicular o confluente a la colonia del organismo ensayado. Este ensayo tiende a confirmar no solamente las propiedades antibacterianas del agente activo, sino también a determinar su espectro antibiótico, o sea, su acción selectiva sobre di-

ferentes bacterias. Mediante tales procedimientos sencillos es posible conocer rápidamente si es prometedor el particular antibiótico. Entonces puede decidirse si están justificadas las etapas que han de seguir, tales como cultivo en distintos medios, aislamiento, etc. No se trata meramente de hallar organismos que sean altamente eficaces frente a las bacterias, u otros microorganismos, sino que interesa también muy particularmente su actividad selectiva. No merece la pena perder el tiempo en el momento presente con un nuevo agente que no fuese superior a la penicilina.

Desde el aislamiento de la estreptomicina en los años 1943-44 me he ocupado principalmente en la investigación de organismos que producen antibióticos activos frente a aquellas bacterias que se han hecho resistentes a la estreptomicina. Para este objeto pueden emplearse como organismos de ensayo las estirpes estreptomicin-resistentes. Así se puede determinar de primera intención si se trata de un tipo de sustancias que corresponden al especial interés anteriormente indicado. En este período de cerca de cinco a seis años han sido examinados unos 50.000 cultivos y varios antibióticos han sido aislados. De éstos, la neomicina parece ser la más adecuada para aquella finalidad, pues todas las estirpes resistentes a la estreptomicina son sensibles a este antibiótico con el mismo grado a como lo son las correspondientes estirpes sensibles a la estreptomicina.

Mediante un grupo de bacterias de ensayo seleccionadas cuidadosamente, es posible identificar antibióticos desconocidos, producidos por organismos recientemente aislados. Supongamos que un organismo desconocido produce un antibiótico que no es activo frente a las estirpes resistentes a la estreptomicina y que favorece el crecimiento de las estirpes estreptomicin-dependientes; deduciremos que debe ser estreptomicina o uno de sus derivados. El empleo de cultivos bacterianos especiales que se les ha hecho resistentes a un determinado antibiótico para la finalidad de identificar nuevos antibióticos, es un nuevo y muy útil instrumento en las manos del investigador de antibióticos. Mediante esos y otros métodos, ha sido posible establecer que un gran número de hongos, bacterias y actinomicetos son capaces de producir antibióticos. Esta propiedad no es característica de la familia, del género, ni siquiera de la especie, sino solamente de ciertas estirpes dentro de determinadas especies. Unos ejemplos serán suficientes.

Se sabe que los hongos producen un gran número de antibióticos. El primero de éstos fué aislado en 1895 y designado con el nombre de ácido micofenólico, y el último en 1949 y designado con el nombre de candidulina. Entre estos dos extremos un gran número de compuestos han sido hallados, tales como la gliotoxina, ácido penicilico, fumigacina, ácido gladiólico, clavacina o claviformina, chetomina, ácido aspergílico, y el más importante de todos ellos: la penicilina. Estas sustancias varían mucho en su espectro

antibiótico, propiedades químicas, toxicidad, actividad in vivo y potencialidades quimioterápicas. De todas ellas, solamente la penicilina ha encontrado amplia aplicación práctica. Además de los hongos inferiores, los hongos superiores, vulgarmente llamados setas, son también capaces de producir algunos antibióticos, siendo el más importante de estos últimos la clitocibina, de la que se han publicado trabajos que dicen tiene un efecto marcado sobre el microbio de la tuberculosis.

Las bacterias son también capaces de producir gran número de antibióticos. Ciertas bacterias esporuladas producen tirotricina, bacitracina, subtilina, subtilisina, polimixina, aerosporina, y algunos otros antibióticos. Ciertas bacterias no esporuladas producen piocianasa, piocianina, prodigiosina, nisina, colicinas y otros antibióticos. De estos antibióticos, solamente la tirotricina, la bacitracina y posiblemente la polimixina, han hallado aplicación práctica en el control de ciertas enfermedades en el hombre y en los animales

Los actinomicetos forman un grupo de organismos a los que he consagrado la mayor parte del trabajo de mi vida de investigador. Hace actualmente treinta y cinco años que comencé, en Rutgers, a estudiar a los actinomicetos como parte de un más amplio proyecto sobre «las bacterias, actinomicetos y hongos del suelo». Cuando primeramente emprendí, en 1939, el estudio de la formación de antibióticos por estos organismos, solamente se conocían dos preparados antibacterianos, producidos por determinadas especies, y eran la actinomicetina y la actynomices-lisozima, ninguna de las cuales era verdadero antibiótico, ni fueron bien interpretadas en su significación. La primera sustancia que aislamos en 1940, fué designada con el nombre de actinomicina. Se trataba de un compuesto cíclico nitrogenado, de color anaranjado y muy tóxico. Es producido por un gran número de actinomicetos y desde entonces ha sido señalado por investigadores de todo el mundo. El siguiente compuesto importante que aislamos en 1941, fué designado con el nombre de estreptotricina. Esta era mucho menos tóxica y muchísimo más eficaz, lo mismo in vitro que in vivo, frente a infecciones causadas por diferentes bacterias, y entre ellas las Gram negativas. Investigaciones realizadas más adelante, revelaron que tenía un efecto tóxico retardado sobre los animales de experimentación.

Antes de que la estreptotricina llegara a ser ensayada clínicamente, aislamos en 1943 la estreptomicina. Este antibiótico parecía suplementar a la penicilina para combatir diversas infecciones bacterianas, ya que la penicilina actuaba principalmente sobre enfermedades causadas por bacterias Gram positivas, cocos y espiroquetas y la estreptomicina sobre enfermedades producidas por bacterias Gram negativas y por bacterias ácido-resistentes. La estreptomicina tenía, sin embargo, ciertas limitaciones, especialmente su efecto perjudicial sobre la condición vestibular de algunos de los enfermos y el potencial desarrollo de

resistencia en las bacterias por un prolongado contacto con este antibiótico. Otros agentes fueron pronto descubiertos en otros laboratorios, siendo los más importantes la cloromicetina, aureomicina y terramicina, especialmente porque son activos sobre rickttesias, y sobre alguno de los virus de mayor tamaño. También hemos aislado nosotros la neomicina y la fradicina, cuyas potencialidades están ahora investigándose. Puede afirmarse con certeza que, desde el descubrimiento de la penicilina, los antibióticos más importantes han sido aislados de actinomicetos. Una reciente estadística demuestra el hecho de que no menos de treinta antibióticos son producidos por actinomicetos.

El simple aislamiento de un organismo capaz de formar un antibiótico deseable constituye únicamente el primer paso en el aislamiento de tales agentes. Luego vienen los problemas en relación con el estudio de los medios más adecuados para el cultivo de dicho orgánismo y la producción del antibiótico. En esta etapa, todavía se manejan preparados crudos y, por tanto, nada se sabe sobre las propiedades químicas del nuevo antibiótico. Todavía hay que recorrer un camino largo antes de que la sustancia activa haya sido aislada al estado puro. La concentración del nuevo antibiótico se mide por su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano y entre tanto se va obteniendo información sobre su naturaleza por su acción selectiva sobre diferentes bacterias, o sea, su espectro antibiótico. En cada etapa del aislamiento y purificación, esta actividad selectiva sobre diferentes bacterias y sobre otros microorganismos debe tenerse presente, para tener la certidumbre de que se trata de la misma sustancia y no de otro agente, puesto que el organismo que produce el antibiótico es un sistema biológico que varía en su naturaleza y que puede originar, bajo diferentes condiciones de cultivo, otros antibióticos diferentes del hallado primeramente.

Se han dado casos en que un investigador llegó al aislamiento de una sustancia totalmente diferente de la que se hallaba presente originariamente en el medio, o diferente de la sustancia en la que él se interesó primeramente y ello debido sencillamente a que medía la potencia del material aislado por su actividad antibacteriana y no había sido suficientemente reconocido el significado del espectro antibiótico de tal material.

Después del método cualitativo de ensayar antibióticos desconocidos, la determinación cuantitativa es lo más importante. Aquí también, hasta que se descubre un procedimiento químico adecuado para medir la concentración del antibiótico, se hace la estimación cuantitativa sobre la base de la actividad del antibiótico sobre un cierto microbio de prueba. El método turbidométrico mide el grado de crecimiento del organismo de prueba en medios líquidos, y el método del pocillo mide el grado de difusión del antibiótico en medios sólidos que se deduce de la zona de inhibición. La selección del organismo de prueba es en estos casos de gran importancia. Algunos antibióticos, tal ocurre,

por ejemplo, en el caso de las diversas penicilinas, están caracterizados por la relación entre las inhibiciones del crecimiento de diferentes bacterias de prueba.

Una vez que el medio ha sido seleccionado y decidido el método de valoración, entra en escena el problema de hacer crecer al organismo en escala industrial. El ingeniero químico, o, quizá mejor el ingeniero bacteriólogo, ha prestado grandes servicios al pasar de los resultados logrados en cultivos en frascos a los cultivos en los grandes fermentadores de diez a cincuenta mil litros de capacidad; los problemas de la aireación y de las contaminaciones han sido problemas de grandes dificultades, pero que fueron resueltos con éxito.

La extracción del antibiótico del medio líquido, su purificación y luego su aislamiento en forma cristalina, implican un número de importantes problemas que son del dominio del químico más que del microbiólogo. La colaboración de los dos es, sin embargo, de lo más importante, por las razones previamente presentadas. El aislamiento de la penicilina, la dilucidación de su estructura química y de sus potencialidades quimioterápicas, serán un monumento a la eficaz colaboración entre químicos y microbiólogos, gobierno e industria, iniciativa individual e investigación en equipo, no solamente en escala nacional, sino también en escala internacional, puesto que fué el resultado de la colaboración de los investigadores de la Gran Bretaña y Estados Unidos. ¿Quién puede argumentar después de lo dicho que la solución de algunos importantes problemas no dependa de este tipo de colaboración? El aislamiento y la utilización de la estreptomicina no fué llevado a cabo en tan gran escala, pero también aquí fué necesaria la colaboración de investigadores en un pequeño laboratorio universitario, en una organización industrial grande y en una clínica importante, antes de que fueran reconocidas las potencialidades de este antibiótico.

Puesto que cada antibiótico representa un tipo diferente de entidad química, en cada caso el químico debe descubrir nuevos métodos para el aislamiento y purificación. Puede utilizar adsorbentes tales como carbones, zeolitas o resinas para separar la sustancia del gran volumen del medio, o puede utilizar disolventes tales como el éter, cloroformo o alcohol butílico para extraer el antibiótico directamente del medio. Puede utilizar cromatogramas sobre papel o sobre zeolitas para separar las diversas entidades antibióticas. Más pronto o más tarde podrá lograr cristalizar el compuesto y determinar su estructura química. Sigue a esto el intento de síntesis. Hasta ahora, el químico ha tenido éxito solamente en tres casos, de los cuales únicamente uno ha tenido interés práctico.

Los antibióticos hasta ahora sintetizados son la c l a v a c i n a , la p e n i c i l i n a y la c l o r o m i c e t i n a , de los cuales únicamente el último es obtenido en escala industrial por síntesis y al producto de síntesis se le designa con el nombre c h l o r a m p h e n i c o l .

Una vez aislado el antibiótico ya al estado crudo o muy purificado, el estudio de su toxicidad y de su actividad i n v i v o debe preceder a su apli-

cación clínica. Esto implica resolver muchos problemas, como lo confirman los numerosos ensayos que realiza el farmacólogo. Finalmente interviene la sección de control estatal, o sea, el Food and Drug Administration, que es requerida por la ley para colocar su sello de aprobación sobre cualquier nuevo medicamento antes de que sea utilizado en el tratamiento de infecciones humanas. El camino es, pues, largo, pero si el final es satisfactorio, ofrece amplia compensación para todos los esfuerzos desplegados.

A través de estas múltiples etapas en el desarrollo de un antibiótico, la parte desempeñada por el microbiólogo es muy importante. El interviene en el aislamiento del organismo productor de antibiótico, en el estudio de los medios adecuados, en el ensayo de sustancias activas y, finalmente, en el estudio del modo de acción de los antibióticos sobre las bacterias sensibles y en otros problemas, tales como el desarrollo de resistencia en las bacterias frente a determinado antibiótico. Numerosas teorías han sido propuestas para explicar la acción de los antibióticos sobre las bacterias, tales como efectos sobre la tensión superficial, interferencia de la división celular o de ciertas reacciones metabólicas. Los diferentes antibióticos pueden no afectar a un mismo mecanismo de nutrición. La estreptomicina, por ejemplo, ha sido demostrado que afecta a la síntesis de aminoácidos por las bacterias. En algunos casos son ciertos mecanismos enzimáticos los interferidos.

Para aclarar el progreso logrado en el estudio de un determinado problema e informarles sobre el tiempo que hemos empleado antes de que este problema haya sido llevado no a una solución satisfactoria, no, muy lejos de ello, pero sí a cierto estado a partir del cual futuros progresos pueden fácilmente ser previstos, pondré como ejemplo nuestro propio trabajo sobre el mycobacterium tuberculosis. Nuestro laboratorio fué primeramente un laboratorio dedicado a la microbiología del suelo; apenas estábamos interesados en el estudio de los microbios patógenos para los animales y, ciertamente, no en esas formas aparentemente especializadas y más bien resistentes, tales como el microorganismo de la tuberculosis, que han planteado distintos problemas que han sido estudiados intensamente durante los últimos seis decenios por muchos eminentes bacteriólogos, químicos y clínicos.

En 1932, el director de investigación de la National Tuberculosis Association vino a verme al objeto de discutir el destino del bacilo tuberculoso en el suelo. Una beca sostenida por el National Research Council, fué establecida en nuestro laboratorio. Después de adicionar durante unos tres años bacterias vivas y muertas a suelos y aguas de alcantarillas, se llegó a la conclusión de que estas bacterias no sobreviven en el suelo mucho tiempo, confirmando así las observaciones hechas por otras investigaciones. Parecía que ciertos organismos que viven en el suelo o en las aguas de alcantarillado, especialmente protozoos, fueran posiblemente responsables de ese efecto. No estábamos interesados por entonces en los antibióticos y, por tanto, no nos

encontrábamos preparados para continuar estos estudios o para asociarlos con el amplio principio del antagonismo microbiano.

Pocos años después, o sea, hacia 1941, una pequeña reunión fué convocada. A esta conferencia asistieron representantes de una clínica especializada en el estudio de la tuberculosis, algunos investigadores médicos, dos o tres químicos industriales y yo. El objeto de la reunión era discutir los caminos y los medios de atacar el problema de la quimioterapia de la tuberculosis. Ante mi asombro, se hizo la sugestión que debería realizarse un estudio de los sistemas enzimáticos que disolvieran al microbio de la tuberculosis. Cuando yo planteé el problema sobre qué tipo de enzimas deberíamos investigar, se hizo la sugerencia de que posiblemente las enzimas proteolíticas podrían ser las más adecuadas. Se puso como ejemplo el que la lombriz de tierra, se decía que era capaz de digerir al bacilo de la tuberculosis. Cuando yo discutí este camino y destaqué el hecho de que para digerir a las células con revestimiento céreo del bacilo de la tuberculosis, tenía que ser hallada una enzima de muy elevada potencia y que, por tanto, podría tener efecto poco deseable sobre los tejidos del organismo, se me pidió que diese sugestiones sobre la forma de resolver este problema. Mi contestación fué que la respuesta probablemente sería hallada no en un mecanismo digestivo o proteolítico, sino en un agente que interfiriera con las reacciones sintéticas de las células o con la división celular; en otras palabras, un mecanismo antibiótico. Con el descubrimiento de la e s t r e p t o t r i c i n a , y más tarde de la e s t r e p t o m i c i n a , hemos tenido éxito en el aislamiento de tales mecanismos. Estos estudios pronto llamaron la atención de los doctores Feldman e Hinshaw, de la clínica Mayo, quienes inmediatamente ofrecieron sus medios para ensayar el efecto de estos antibióticos sobre la tuberculosis experimental y después sobre la tuberculosis clínica.

Se vió después que la estreptomicina es un agente activo, pero no el agente ideal contra la tuberculosis. No era ciertamente la cura ansiada para vencer a la peste blanca que aflige a la humanidad. Tenía sus limitaciones definidas.

Sin embargo, estas investigaciones establecieron las grandes potencialidades que existen en el campo de los antibióticos para el control de la tuberculosis. Se trataba, pues, de buscar otros agentes que estuviesen libres de aquellas limitaciones y sirvieran para suplementar a la estreptomicina. Un antibiótico que ha sido recientemente aislado en nuestro laboratorio y al que hemos designado con el nombre de n e o m i c i n a , parece ofrecer grandes promesas en este aspecto. Si hubiese sido descubierto este antibiótico hace diez años, probablemente hubiese resultado ser un agente quimioterápico ideal. Como ahora la penicilina, la estreptomicina y algunos otros antibióticos son de uso práctico para el control de las infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, ácido-resistentes y rickettsias, un nuevo agente debe ser muy superior

o, en general, mucho más eficaz contra las bacterias en general, o debe ser activo frente a aquellos microbios que son resistentes a los otros antibióticos. Los datos en relación con la acción de la neomicina comparada con la estreptomicina revelan el hecho de que la neomicina tiene dos propiedades muy deseables, aparte de su elevada potencia frente al microbio de la tuberculosis y frente a otras bacterias. Una de esas propiedades es su actividad frente a aquellos organismos resistentes a la estreptomicina. El hecho de que favorezca menos el desarrollo de la resistencia entre las bacterias sensibles, es también de gran importancia. Ambos antibióticos poseen no solamente propiedades bacteriostáticas, sino también marcadamente bactericidas. Ambos son muy estables a la acción de los microorganismos y ambos son favorecidos por una reacción alcalina.

Resumiendo nuestro conocimiento presente de los antibióticos como agentes quimioterápicos he intentado clasificar todas las enfermedades humanas en nueve grupos. Esto permite ilustrar el progreso que ha sido logrado en este muy corto período de tiempo mejor que cualquier otra cosa que podría presentarles y podría justificar plenamente el nombre que ciertas autoridades médicas han dado a esta era al llamarla *era de los antibióticos*.

1. **Enfermedades causadas por bacterias Gram positivas y por algunos cocos Gram negativos.**—Los organismos causantes de estas enfermedades son muy sensibles a diversos antibióticos. La penicilina es utilizada ampliamente para el tratamiento de estas enfermedades. La tirotricina y la bacitracina han hallado ciertas aplicaciones para el tratamiento de heridas infectadas y otras enfermedades causadas por algunas de estas bacterias. Los organismos que se hacen resistentes a la penicilina o las estirpes con resistencia natural a ese antibiótico, son corrientemente sensibles a la bacitracina, a la estreptomicina o a ciertos otros antibióticos. Este grupo de enfermedades puede, pues, considerarse que se combate con éxito con la penicilina y otros antibióticos.

2. **Enfermedades causadas por bacterias Gram positivas.**—Estas bacterias son, en su mayoría, resistentes a la penicilina, pero son sensibles a la estreptomicina y a algunos otros antibióticos. Estos se aplican extensamente en el tratamiento de las enfermedades causadas por organismos Gram negativos. La polimixina, la aureomicina y la neomicina son otros agentes muy prometedores. El uso de dos antibióticos en lugar de uno sólo, tal como la estreptomicina, con un compuesto de síntesis tal como la sulfodiazina, o el ácido para-amino-salicílico, tenderá a evitar el rápido desarrollo de la resistencia en las bacterias a la estreptomicina.

3. **Enfermedades causadas por bacterias ácido-resistentes.**—Estas enfermedades se estimaba que estaban entre las más resistentes a la quimioterapia. La estreptomicina se ha visto que es eficaz *in vivo* y es ampliamente utilizada. Cuando es suplementada con ácido para-amino-salicílico o alguna de las sulfonas, la estreptomicina ha resultado en algunas ocasiones más eficaz, especial-

mente para retrasar el rápido desarrollo de la resistencia. Existen otros agentes prometedores, tales como la neomicina.

4. **Enfermedades producidas por Espiroquetas.**—Algunos antibióticos, especialmente la penicilina, tienen un efecto notable sobre las enfermedades causadas por espiroquetas. El uso de la penicilina en el tratamiento de estas infecciones va gradualmente reemplazando al tratamiento corriente anterior al advenimiento de la terapia antibiótica.

5. **Enfermedades producidas por Rickettsias.**—Cierto número de antibióticos, especialmente la cloromicetina y la aureomicina, se utilizan actualmente con eficacia en el tratamiento de las enfermedades causadas por Rickettsias.

6. **Enfermedades producidas por Virus.**—Ningún antibiótico ha sido todavía descubierto que pueda ser empleado con éxito frente a las enfermedades producidas por los virus de menor tamaño, tales como el resfriado corriente, la influenza o la poliomielitis.

Sin embargo, algunos de los virus de mayor tamaño, tales como el de la psitacosis, linfogranuloma y algunos tipos de virus de la neumonía atípica, son sensibles a varios antibióticos.

7. **Enfermedades producidas por Hongos.**—Cierto número de antibióticos son capaces de atacar a los hongos. Esto ocurre con la gliotoxina, clavacina, estreptotricina, actidiona, antimycina y fradicina. Uno o más de éstos pueden hallar aplicación en el control de muchas de las enfermedades producidas por los hongos en los animales y plantas.

8. **Enfermedades producidas por Protozoos.**—Algunos protozoos capaces de producir infecciones en el hombre son susceptibles al ataque de los antibióticos, tal ocurre con la estreptocina, que actúa sobre los Trichomonas. El significado terapéutico de este hecho aún no ha sido establecido.

9. **Tumores.**—Aunque no se conoce al presente antibiótico eficaz que pudiera ser utilizado para combatir las infecciones causadas por células extrañas, tales como los tumores, se sabe que ciertas bacterias, hongos (Aspergillus fumigatus) y protozoos, son capaces de atacar a los tumores, y quizá algún día puedan suministrar agentes prometedores. La quimioterapia ha hecho progresos rápidos desde los tiempos de Ehrlich. El microbiólogo y el químico, por su contribución a la realización de los antibióticos, han puesto en las manos del clínico poderosas armas para el tratamiento de numerosas infecciones, muchas de las cuales eran previamente rebeldes al tratamiento terapéutico. Aunque muchas enfermedades aún permanecen inconquistadas, el futuro se presenta brillante. La búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos está solamente en sus comienzos. Los microbios, los microbios buenos, esas formas inferiores de la vida que existen en tan gran abundancia en nuestros suelos, en los abonos complejos, en nuestros arroyos y lagos, poseen mecanismos que son destructivos para los microbios causantes de enfermedades.

No debemos limitarnos a descubrir agentes que nos permitan la eliminación

final de las enfermedades infecciosas del hombre, de los animales y de las plantas, sino que hay que estudiar el mecanismo por el cual destruyen a los microbios causantes de las enfermedades.

Quizás algún día se sinteticen compuestos que realicen esa destrucción con mayor eficacia. Al domesticar a los microbios para la producción de los antibióticos, el microbiólogo ha realizado otra gran contribución al bienestar de la humanidad.

Espectro comparativo de la neomicina y de la estreptomicina.

Cantidades por cada c. c. de medio de cultivo que se requieren para inhibir el crecimiento de los microbios que se citan.

Microorganismo	Neomicina U/c.c.	Estreptomicina γ/c.c.
Aerobacter aerogenes	0,63	0,5 -2,5
Bacillus mycoides	0,1 -0,5	0,1 -3,8
B. subtilis	0,02-0,1	0,12-1,0
Brucella abortus	1,25-5,0	0,5 -3,8
B. melitensis	0,63-2,5	0,5
Clostridium perfringens	> 10,0	> 100,0
Corynebacterium diphtheriae	0,16	0,375-3,8
Escherichia coli	1,25-2,5	0,3 -3,8
Hemophilus influenzae	1,25-2,5	1,56 -5,0
H. pertussis	2,5	1,25 -3,0
Klebsiella pneumoniae	0,312-0,63	0,63 -8,0
Mycobacterium avium	0,1 -0,3	10,0
M. tuberculosis	< 0,5	1,0-5,0
M. tuberculosis R.	< 0,5	> 100
Pasteurella pestis	0,63	0,75-1,5
P. tularensis	0,16	0,15-0,3
Phytomonas pruni	0,1	0,25
Proteus vulgaris	1,25- 2,5	0,4- 3,0
Pseudomonas aeruginosa	12,5 -25,0	2,5-25,0
Salmonella typhosa	0,1 - 0,63	1,0-37,5
S. schottmülleri	0,4 - 0,7	2,0
Sarcina lutea	2,5	0,25
Serratia marcescens	1,25	1,0
Shigella paradysenteriae	0,25-0,5	0,25- 3,75
Staphylococcus aureus	0,16-0,63	0,5 - > 16,0
Streptococcus faecalis	5,0	50,0
Vibrio comma	2,5	6,0-37,5
Fungi	> 10,0	> 10,0

BIBLIOGRAFIA

De la muy extensa literatura sobre una materia que se amplía continuamente, el conferenciante ha escogido ocho referencias que representan diferentes aspectos del tema tratado.

WAKSMAN, S. A. 1944. Antibiotics. **Biol. Rev. Cambridge Philosop. Soc.,** 23: 452-487.

——— 1944-45. Production and nature of antibiotic substances. The Harvey Lectures. Series XL. 77-101.

——— 1948. Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances. 2nd. E., pp. 415, New York Commonwealth Fund.

——— 1949. Origin and nature of antibiotics. **Amer. Jour. Med.,** 7: 85-99.

——— **FRANKEL, J.,** y **GRAESSLE, O.** 1949. The in vivo activity of neomycin **Jour. Bact.,** 58: 229-237.

——— **HUTCHISON, D.,** y **KATZ, E.** 1949. Neomycin activity upon Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. **Amer. Rev. Tuberc.,** 60: 78-89.

——— y **LECHEVALIER, H. A.** 1949. Neomycin, a new antibiotic active, against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. **Science,** 109: 305-307.

——— **LECHEVALIER, H. A.,** y **HARRIS, D. A.** 1949. Neomycin production and antibiotic properties. **Jour. Clin. Invest.,** 28: 934-939.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL Y APLICADA
SECCION DE BACTERIOLOGIA
C. S. I. C.

BACTERIAS Y MOHOS PROCEDENTES DE CULTIVOS DE FOLICULOS TRACOMATOSOS

A. Socías.

Desde el comienzo de nuestras investigaciones sobre el agente microbiano del tracoma, pretendimos hacer luz sobre la enmarañada cuestión de las inclusiones de von Prowazek, así como sobre si el B a c t e r i u m g r a n u l o s i s de Noguchi era el microbio en cuestión. Para una revisión crítica de estos dos aspectos véase nuestro estudio (1), que data de 1936. Examinamos, para el estudio de los citados corpúsculos, varios cientos de extensiones de la materia lardácea que salta bajo la presión del rodillo de Knapp en una conjuntiva tracomatosa, así como frotis de raspados de las conjuntivas tracomatosas. No cabe duda que en la mayoría de los casos se pueden observar las inclusiones dichas, como puede verse en la figura 1; pero no es menos cierto que creemos

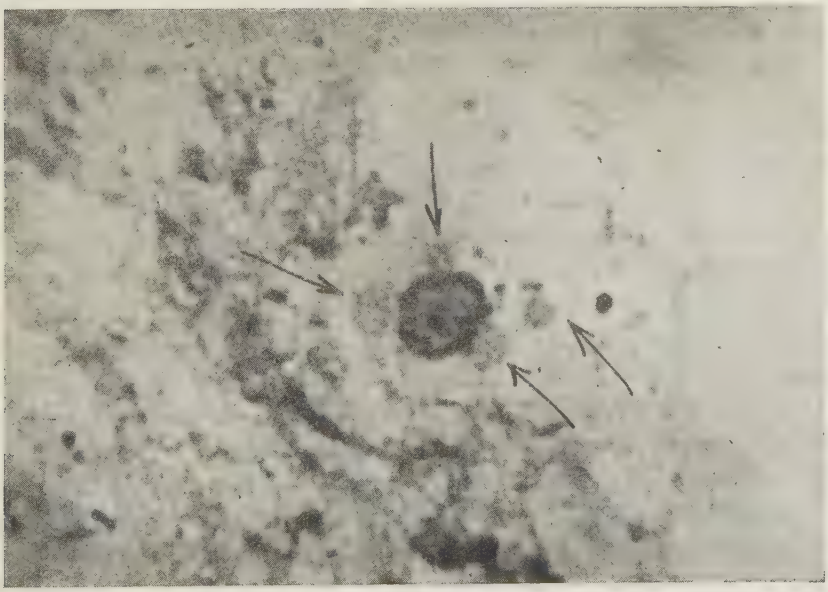


Fig. 1.

también observarlas en conjuntivitis que nada tienen que ver con el tracoma, así como en ciertas conjuntivas que, al parecer, están sanas. De aquí que terminásemos por no atribuirles importancia patógena.

En cuanto al contenido de la sustancia lardácea que salta en la expresión de la conjuntiva tracomatosa y que se supone corresponde al contenido de las granulaciones en la fase T-2, describíamos entonces unas formaciones como sigue: «... se puede distinguir que tales masas están formadas de elementos muy pequeños en general, esféricos y difícilmente coloreables, haciéndose la mayoría de las veces visibles como un punto casi geométrico teñido de azul intenso y rodeado de una corona refringente, el total tiene escasamente una micra de diámetro, más la circunstancia de que tan sólo se tiñe el centro, cuya dimensión es de unas décimas de micra; es decir, en los límites de la visibilidad, hace que su discriminación sea en extremo difícil. En otros casos el corpúsculo se hace más visible, aunque siempre algo confuso de contornos porque queda todo él de un color azul violáceo, que por la disposición especial hace pensar que más que una tinción del material, lo que allí ha habido ha sido una precipitación del colorante en la superficie, y más que en la superficie, en los espacios que quedarían entre tales corpúsculos al reunirse en conglomerados, que es una de las maneras más frecuentes de presentarse o de ser vistos. En ciertos casos, el punto interior capaz de tinción aumenta de tamaño y se hace más visible, pero bien entendido, son los menos. La corona, que en general es refringente, puede tomar algo el colorante; entonces aparece de un rosa tenue. Sucede también que todo el corpúsculo no se coloree y sólo resulte visible, debido a que, como hemos dicho, por lo general se presenta en agrupaciones de muchos de estos elementos, que parece tienen una cierta tendencia a agruparse en asociaciones que toman delimitaciones ovales o esferoidales y si las circundantes de la misma naturaleza se han teñido, queda una de ellas refringente sin teñir y visible en negativo...» «... no siempre el corpúsculo simple tiene la forma esférica, sino que a veces toma otras más o menos alargadas, podríamos decir que en coco-bacilo y entonces el centro coloreado toma forma de coma, siempre rodeado de la parte externa refringente, lo que le da al microscopio un aspecto de extrema delgadez...» «... Nosotros hemos encontrado estos elementos en los granulomas tracomatosos en un 100 por 100 de casos.»

En otra comunicación (2) decíamos, referente a la denominación de estos corpúsculos, lo que sigue: «En tal época, los denominamos c o r p ú s c u l o s s o l a r e s o d e R á, por considerar que su forma más simple tenía el aspecto de un punto, coloreado por el Giemsa en azul violeta y rodeado de una esfera refringente no coloreada. Aspecto que recuerda el de la representación del dios solar—Orus o Rá—en los jeroglíficos egipcios y siendo, por añadidura, el valle del Nilo el gran exponente de la endemia, consideramos bien denominarle de tal manera.» «Las formas de su evolución serían las siguientes: a) C u e r p o e s f e r o i d a l, cuyo volumen es algo mayor que el de los

corpúsculos y que se colorea más intensamente que éstos, perdiendo la esfera refringente; siendo su tamaño desde el de un coco corriente—una a dos micras—al de una levadura—diez y más micras—. Su interior está teñido homogéneamente y no diferenciado. b) Cuerpos en diferenciación. Su tamaño es como el de los anteriores o mayor y difiere de ellos en que su tinción no es tan intensa ni tan homogénea, comenzando la diferenciación en corpúsculos de Rá.»

En la misma comunicación decíamos: «Los compúsculos de Rá tendrían, además, según nosotros, otra manera de evolucionar, penetrando en el interior del núcleo celular. Esta evolución intranuclear, que hoy día la consideramos muy frecuente, es de difícil observación, por confundirse tales corpúsculos con la misma cromatina nuclear. Cuando con la extensión se rompen las células parasitadas es cuando se observan más fácilmente, constituyendo entonces lo que llamamos conglomerados secundarios, que no serían más que los conglomerados primarios agrupados mediante la sustancia nuclear.» Esta interpretación cambió más adelante, según indicaremos en la próxima publicación, ya que lo que considerábamos célula del granuloma tracomatoso pasó a ser considerado como formas del microorganismo causante del mismo.

«Von Prowazek tuvo especial cuidado en señalar que sus cuerpos iniciales y sus corpúsculos elementales se encontraban sólo en el protoplasma de las células epiteliales de la conjuntiva o de la córnea y nunca en las diversas clases de células frecuentes en el granuloma. Esta afirmación no nos lo explicábamos nosotros, al encontrar en gran abundancia nuestros corpúsculos en el interior del granuloma, cuando se nos reveló cierta, en parte. Queremos decir que, para nosotros al admitir un ciclo evolutivo de los corpúsculos, no todos los momentos morfológicos se encontrarían indistintamente en las células de la conjuntiva, de la córnea o del granuloma, sino que, más bien, cada una de estas formas tendría una apetencia para una localización determinada. Así es como consideramos que los cuerpos esferoidales donde se encuentran con más frecuencia es en las células epitaliales de la conjuntiva y de la córnea y corresponderían cuando son de pequeño tamaño, es decir, cuando casi aún no se han diferenciado de los corpúsculos de Rá, con los corpúsculos de von Prowazek y a medida que fuesen creciendo se irán convirtiendo o correspondiendo con los cuerpos iniciales de tales autores. Por tanto, hemos dicho que la afirmación de tales autores sería cierta en tanto se limitara tan sólo a considerar tales formas como inclusiones o elementos celulares reaccionales ante el virus o como el virus mismo. Para nosotros, su error, mejor dicho, su omisión, se encontraría en que no describieron otras etapas morfológicas de la evolución de las inclusiones—nuestros corpúsculos de Rá—localizadas en el granuloma mismo. Formas que no tan sólo hemos dicho que existen, sino que las consideramos mucho más abundantes y representativas del virus. Los momentos morfológicos más frecuentes en el protoplasma de las células del granuloma serían los de cuerpos

diferenciados. Estos cuerpos se encuentran con una gran frecuencia intercelularmente colocados en los frotis de los granulomas.»

A continuación de esta misma comunicación, hacíamos una crítica de los llamados cuerpos rickettsoides del tracoma, que creemos que coinciden en cierta manera con nuestros corpúsculos de Rá y sus formas evolutivas en cuanto a morfología, pero que nosotros de ninguna manera podemos considerarlos como de la naturaleza de las Rickettsias. En el tracoma nunca se puede encontrar ni sospechar la intervención de un insecto vector. El papel de las moscas que ciertos autores consideran importante, nosotros en España no le damos valor alguno, o si existe, muy secundario.

En tal crítica (2) comentábamos la confusión introducida por los distintos autores, pero es más grave la falsa ruta iniciada con esta errónea interpretación de una morfología que ha llegado a querer encontrar hasta relaciones entre tracoma y tifus exantemático, y que al fin ha conducido a clasificar al agente de tracoma como un virus del tipo parecido a las Rickettsias, y la última edición del «Bergey's Manual of determinative Bacteriologie» de 1949 lo denomina: Chlamydozoon trachomatis, especie perteneciente al Género I, Chlamydozoon Halberstaedter y von Prowazek; correspondiente a la Familia III Chlamydozoaceae Moshkovsky, del orden de las Rickettsiales, Gieszczykiewicz.

Vemos, pues, que las inclusiones de von Prowazek, por una parte y los llamados cuerpos ricketsiformes por ciertos autores, por otra, corresponden propparte a nuestros corpúsculos de Rá en su ciclo evolutivo. Estos elementos corpusculares por nosotros descritos se encuentran en el 100 por 100 de casos en una de sus fases evolutivas en el granuloma tracomatoso.

Aparte de estos elementos considerados como formas parasitarias, nosotros con cierta frecuencia hemos encontrado en los frotis formaciones cuya morfología corresponde ya claramente a una forma bacteriana clásica. Unas veces, estas formas corresponden a bacilos muy finos, casi en forma de vírgula (fig. 2); en otros casos, la forma bacilar es típica, pero los bastones son aun más bien finos y cortos, y por último, una forma bacteriana de dimensiones grandes y gruesas que más adelante comprobaremos corresponden plenamente a un tipo de bacteria que aislamos de las lesiones tracomatosas (fig. 3). En raros casos vimos, al parecer, esta misma bacteria con una cápsula bien definida (fig. 4).

En 1936, en su primera mitad nos dedicamos a hacer cultivos de la parte lardácea, ya citada, procedente de la expresión de conjuntivas tracomatosas tipo T-2, y a este fin usamos un medio de cultivo como el de Loewenstein—para aislar el bacilo tuberculoso—, con la diferencia que no poníamos el coloranta que el citado autor utiliza para evitar el crecimiento de otros gérmenes que no sean el tal bacilo. También se usó el medio citado, con la modificación de añadirle cinco centímetros cúbicos de bilis de buey por litro de medio.

Fig. 2.

La manera de hacer la siembra es como sigue: Se coge la parte lardácea dicha—que suele tener el tamaño de un grano de mijo—y con el asa de platino se le frota por encima del medio, procurando dejar una parte entera de la sus-

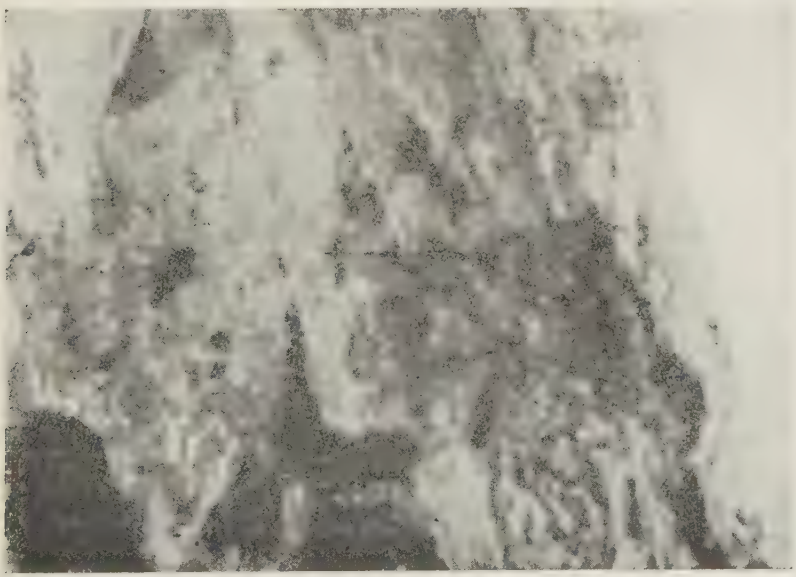


Fig. 3.

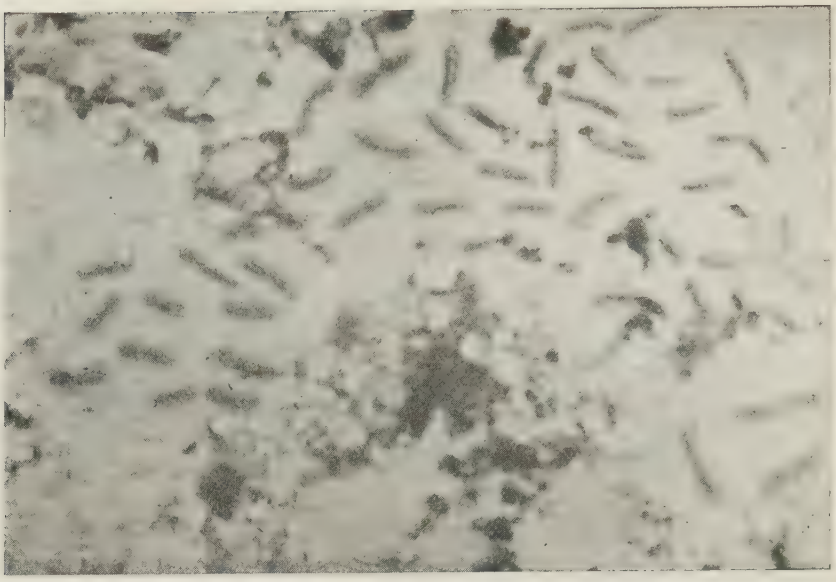


Fig. 4.

tancia depositada en el medio, ya que suele ser sobre esta fracción donde en un 90 por 100 de casos aparece la colonia de tipo (a') que luego describiremos, y en cambio, las de tipo (b) suelen aparecer sobre la parte del medio que ha sido frotada solamente con la siembra.

En aquella ocasión se sembraron once casos y los resultados fueron como sigue:

Se llevan los tubos sembrados a la estufa a 37 grados y a las venticuatro horas comenzaron a aparecer colonias de dos tipos: una, denominada (a), de superficie rugosa, elevada y relativamente seca, no brillante, de bordes unas veces algo festoneados y otras regulares, y de un color blanco crema; tamaño: tres a cuatro milímetros. Esta tiende a aparecer sobre la porción de granulación que hemos sembrado sin desmenuzar; suele estar constituída por bacilos con un aspecto de Corynebacterium (fig. 5). Otra la denominamos (b) y es de superficie lisa, plana. húmeda y brillante; de bordes regulares y de color que tiende al amarillo-naranja; tienen una cierta tendencia a digerir e invadir así todo el medio o un buen trozo del mismo. Están constituídas por bacilos de cinco a diez micras de contornos regulares, de protoplasma más o menos granuloso y Gram positivo. Se ven en las resiembras formas mucho más largas que llegan a tener hasta 20 micras. Estas colonias tienden a surgir sobre el medio que sólo ha sido frotado en la siembra (fig. 6).

Las colonias de tipo (a'') en estos dos medios tienden a dar un pléomorfismo en sus microorganismos, ya que son frecuentes las formas en coco-bacilo y for-

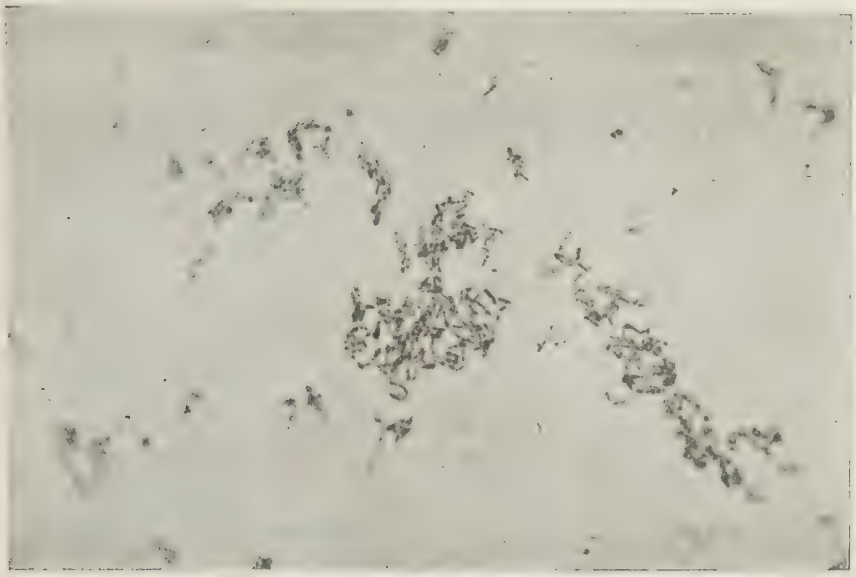


Fig. 5.

mas aovadas, irregularmente teñidas. En la mayoría de los casos era frecuente que en la segunda resiembra resultara una disociación en col. a, a' y b (fig. 7).

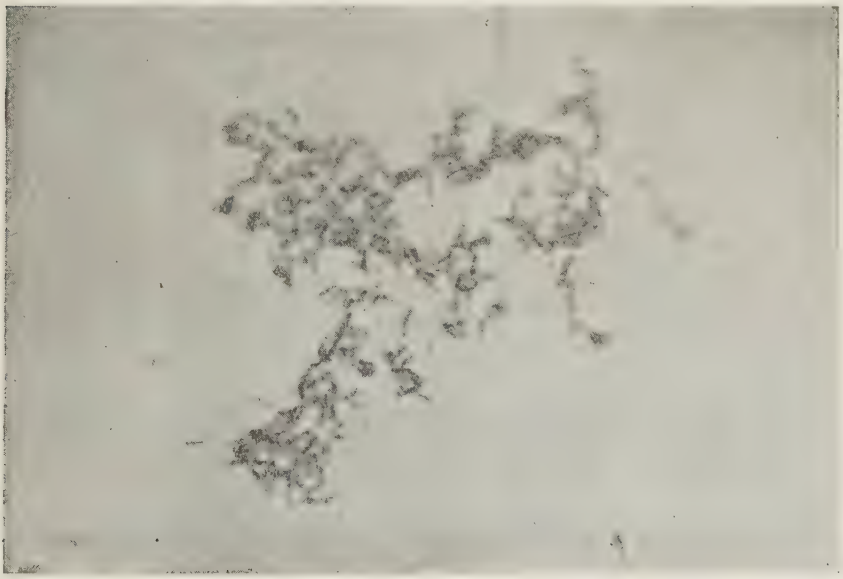


Fig. 6.

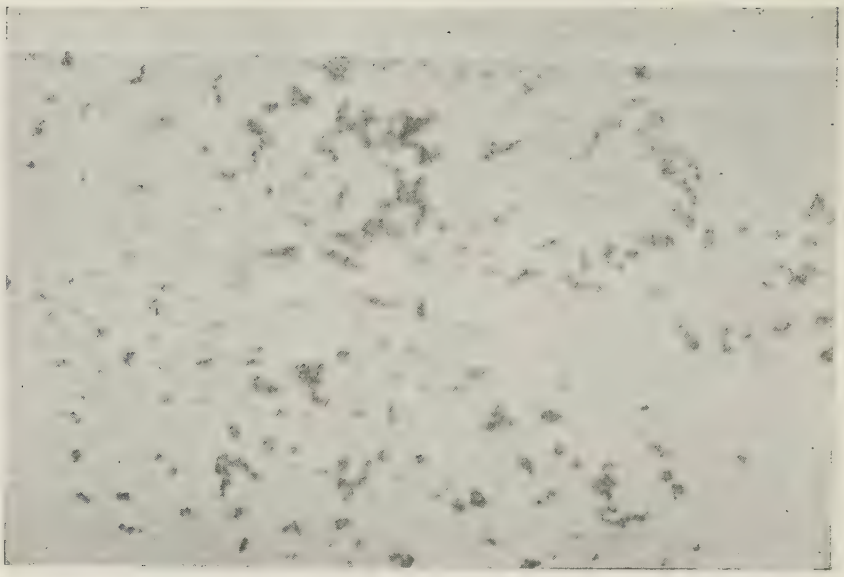


Fig. 7.

Cuadro de las siembras en 1936.

Siembras	Medio Loew.	Medio Loew. mod. Bil.
1	—	a y b
2	a (6)	a (5)
3	a (7)	b (9)
4	a (1)	a (x) y (b) (3)
5	a (3) y b (1)	a (9)
6	a (x) y b (x)	b (9)
7	a (12)	a (x)
8	b (1)	a (x) y b (1)
9	a (4) y b (1)	a (x) y b (x)
10	b (2)	a (x) y b (3)
11	a (x) y b (x)	a (x) y b (x)

Los tubos de control permanecieron sin colonias.

Las circunstancias de los años siguientes hasta 1940 fueron causa de interrupción de estos trabajos.

Como hemos indicado, parecía haber una diferencia en cuanto al tipo de colonia que surgía, según que se tratase de una buena porción de sustancia lardácea sembrada o que sólo hubiese escasa cantidad de esta sustancia—la

que queda sobre el medio después del frotis—. En el primer caso había mayor frecuencia de las colonias de tipo (a) ó bien de tipo micrococo que llamaremos (a'), y en el segundo aparecía con más frecuencia el tipo (b).

Sospechamos si se trataba de una diferencia de pH, y con tal hipótesis, hicimos otras siembras cambiando el pH del medio. Las siembras se hicieron a 37 grados en Loewenstein, cuya solución madre de asparagina tenía, una, pH 4,5, y otra, pH 6, y los resultados fueron los siguientes: Hubo una diferenciación más amplia de las colonias, de tal manera, que la col. (a) que habíamos diferenciado en dos, la (a) y la (a'), daría, además, un tercer tipo: la (a''). Las colonias (a'), siendo mate y de color blanco-crema resultan más brillantes que la (a). Las colonias (a'') se caracterizan principalmente porque los bordes suelen tener una depresión del medio cuya superficie tiene un aspecto irisado y tendiendo a ser más brillantes que las (a'); estas colonias se observan en el medio donde han nacido; luego—en las resiembras—tienden a convertirse en colonias de tipo (a), (a') y (b).

En las colonias de tipo (b) podemos observar, también, dos modalidades de colonias. En todas ellas la forma es mucho más aplanada que las anteriores y los bordes tienden o son claramente festoneados; su aspecto es brillante de superficie lisa. Las colonias (b') tienen un parecido con la (a'') y sus contornos son irregulares y tienen un color salmón. Las colonias (b) son de contornos regulares.

Las colonias (a) suelen dar por microscopía un bacilo de tipo Corynebacterium, y en las (a') suelen aparecer formas cocobacilares o franca-

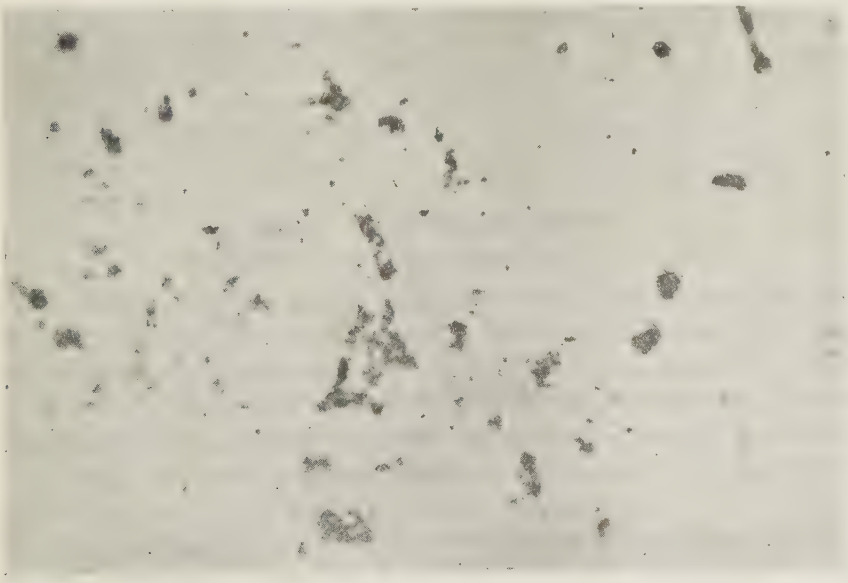


Fig. 8.

mente Micrococcaceas o Diplococcaceas Gram positivas (fig. 8). Las colonias de tipo (a'') tienen tendencia a aparecer sobre el medio de cultivo y dan unos bacilos finos, de grosor uniforme y con tendencia a ser Gram negativos, con la particularidad que con gran frecuencia se encuentran mezclados con formas como las de (a) y (a') y otras irregulares y pleomorficas.

Las colonias tipo (b) dan con frecuencia un diplobacilo Gram negativo de cinco a siete micras, de bordes regulares y de tinción granulosa. Estas colonias se confunden en muchos casos fácilmente con las del tipo (a''). Las colonias de tipo (b) dan un bacilo Gram positivo de 12-20 micras, de aspecto granuloso, que resembradas en agar común dan bacilos esporulados.

Segunda Serie.

Siembras	Medio, pH 4,5	Medio, pH 6
12 (1.753)	(a)	(a'') (b)
13 (143)	(a)	(a')
14 (848)	—	(b')
15 (849)	(a') (a'')	(b')
16 (290)	(a')	(b)
17 (761)	(a')	(b)
18 (53)	—	(b')
19 (54)	(a)	(a'')
20 (4.041)	(a')	(a'')
21 (4.040)	(a'')	(a'')
22 (4.039)	(a')	(b)
23 (4.034)	(a)	(a'')
24 (338)	(a')	(b)
25 (4.033)	—	(a'')
26 (762)	—	(a'')

Los tubos de control sin colonias.

En esta segunda serie de siembras lo que interesa es que tuvimos la impresión de que las colonias descritas, al menos en el cultivo original, no eran estables, sino que luego, o ya en la primera resiembra, podría surgir un tipo de colonia algo distinto y que a la postre tendían todas a dar uno de los tres tipos (a), (a') y (b). O sea, que en un comienzo había una variación o disociación que luego en las resiembras se perdía quedando unos tipos fijos.

Tercera serie de siembras para seguir las colonias en resiembras sucesivas. Se usa medio de Loewenstein a pH 6 en la solución madre, y se incuban los tubos sembrados a 37 grados.

Tercera Serie.

Siembras	Colonias. (Cuatro-cinco días)
27	(a) (a')
28	(a'')
29	(b')
30	(a') (a'')

Estirpe número 27.

Las siembras en el medio indicado del 28-IV-42 dan varias colonias de tipo (a) y (a') que aparecen sobre los folículos que han quedado sembrados sin extender, desmenuzándolos. En resiembras sucesivas, estas colonias siguen dando el mismo tipo de colonia y de microorganismo. El día 23-VII-42 es resembrado el tubo I que había dado colonias (a) y sobre el mismo medio da colonias de tipo (b).

Estirpe número 28.

Las siembras en el medio indicado del 9-VI-42 no dan crecimiento hasta el cuarto día y tan sólo una colonia en el tubo II que es de tipo (a''). En la primera resiembra no crece y en las sucesivas tan sólo aparecen colonias tipo (a). La primera se encontraba sobre el medio.

Estirpe número 29.

Las siembras en el medio indicado el 9-VI-42 dan crecimiento abundante a las veinticuatro horas en todos los tubos, dan colonias sobre el medio de cultivo y no sobre los folículos sin extender y son del tipo (b'). En las siguientes resiembras aparecen colonias del tipo (b) procedentes de las anteriores.

Del tubo I aparecen colonias del tipo (a') a los quince días y sobre los folículos sin extender. En las sucesivas resiembras tiende a ser del tipo (a'').

Estirpe número 30.

Las siembras en el medio indicado el 23-VI-42.

En el tubo I sobre folículos aparecen colonias del tipo (a) y (a').

En los tubos II y III aparecen colonias de tipo (a'') sobre el medio de cultivo. Estas colonias son resembradas en el mismo medio y van surgiendo colonias de tipo (a'') y (b).

Una de estas colonias es resembrada en el mismo medio de pH 5 el 18-II-43 y luego se conserva a temperatura ambiente—22 grados—, y a los dos meses descubrimos que hay una colonia de tipo de moho que resulta ser un Aspergillus. Corresponde al primitivo tubo II.

Otro tanto pasa con una colonia procedente del tubo III.

Podíamos suponer que estas colonias son procedentes de una contaminación del medio; pero por las circunstancias de su crecimiento y los métodos de

técnica depurada que seguimos, nos formamos la convicción que procedían de las colonias de tipo (a''), pero no teníamos pruebas categóricas. Además, todo esto era poco ortodoxo en microbiología.

Cuarta serie de siembras.

Estas siembras se hacen como las anteriores de casos de tracoma diagnosticado clínicamente de T-2, y como medio de cultivo se emplea el medio de Loewenstein sin modificar, con la única diferencia que no lleva colorante y los tubos sembrados se incuban a 25 grados. Tomamos especial cuidado en lavar bien la conjuntiva y procurar la asepsia mayor posible. El lavado se lleva a cabo con s. s. estéril, y el material quirúrgico, paños, etc., está esterilizado.

También se usa como medio de cultivo el Czapek-maltosa-agar y en este caso usamos el Loewenstein con pH 6.

Cuarta Serie.

Siembras	Medio	Tipo de colonias
31	—	—
32	—	—
33	—	—
34	—	—
35	Loew.	As.
36	íd.	a' a b
37	íd.	As.
38	íd.	As. a' a b
39	íd.	As. a' a a''
40	íd.	As. a' a a''
41	íd.	a''
42	íd.	a a''
43	íd.	As. a a''
44	Loew. pH 6 y C-M-A	b
45	íd.	a' a''
46	íd.	a' a b
47	íd.	a' a
48	íd.	a' a a''
49	Loew.	a a'' b
50	íd.	As. a' a a''
51	íd.	a' b
52	Loew. pH 6 y C-M-A	a' a''

Estirpe número 35.

Se siembra un solo tubo de medio Loewenstein; temperatura de incubación, 25 grados. A los cinco días aparecen unas colonias de tipo Aspergillus. Se resiembra indefinidamente conservando su naturaleza.

Estirpe número 36.

Se siembra un solo tubo de medio Loewenstein; temperatura de incubación, 25 grados. A los tres días aparecen varias colonias de tipo (b), que en un principio tienen un color blanco-lechoso que pasa a amarillo naranja al cabo de unos días. A los diez días, el medio empieza a estar digerido.

En este tubo puesto a los ocho días a temperatura de 37 grados, aparecen colonias de tipo (a) y (a').

Todas estas colonias son resembradas en estado de pureza, al parecer.

Estirpe número 37.

El mismo tipo de siembra que las anteriores 36 y 37.

A los tres días aparecen dos colonias del tipo Aspergillus, que se resiembran en C. M. A. indefinidamente y sin cambiar de naturaleza.

Estirpe número 38.

El mismo tipo de siembra que los tres anteriores.

A las cuarenta y ocho horas se aprecian: colonias pequeñas y abundantes sobre el medio de cultivo y tienen el aspecto de tipo (a); otras varias sobre un además de las colonias As., da también abundantes colonias de tipo (a'). hay una colonia de tipo Aspergillus,

La colonia (a) resembrada a 37 grados se disocia en dos tipos a través de las resiembras: tipo (a) y tipo (b).

La colonia (a') resembrada a 37 grados tiende a dar colonias de tipo (a'') y (a').

La colonia de tipo Aspergillus, en la primera resiembra a 37 grados, además de las colonias As., da también abundantes colonias de tipo (a').

Los protocolos de estas siembras son, desde luego, mucho más complejos, y tan sólo hemos expuesto el resumen según nuestra interpretación. Tenemos la impresión que, al menos en este caso, la mayoría de colonias en un principio pertenecen al tipo (a'') y luego de ellas procede una disociación en (a), (a') y (b). Las primeras colonias, de todas maneras no dan la sensación de contener mezclas de gérmenes, sino que tienen un aspecto morfológico uniforme, de aquí que usemos el término disociación para la serie de colonias que surgen en las resiembras (fig. 9).

Estirpe número 39.

Se siembran dos tubos en condiciones iguales a los últimamente descritos.

En el primer tubo se encuentran colonias de tipo (a) y (a').

En el tubo segundo hay colonias de tipo principalmente (a'') y una de tipo Aspergillus.

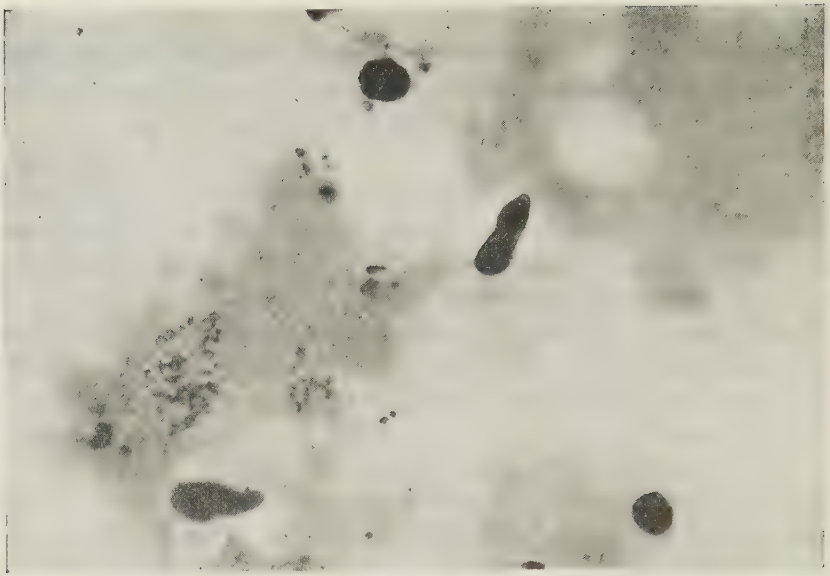


Fig. 9.

Estirpe número 40.

Se siembran dos tubos en condiciones iguales a los últimamente descritos.

En los dos tubos originales hay gran número de colonias de tipo Aspergillus y mezcladas con estas otras, gran número de colonias de tipo (a').

Estirpe número 41.

Se siembra un tubo en condiciones iguales a los últimamente descritos.

Sólo aparecen unas colonias de tipo (a''), que a los pocos días ya no pueden resembrarse.

Estirpe número 42.

Se siembra un tubo en condiciones iguales a los últimamente descritos.

Aparecen colonias de tipo (a), muy escasas, y abundantes de tipo (a''), pero que son difíciles de resembrar.

Estirpe número 43.

Se siembran tres tubos en condiciones iguales a los últimamente descritos.

En el tubo I aparecen colonias de tipo (a) y (a''). En el tubo II abundantes colonias de tipo (a'') y una de tipo Aspergillus. En el tubo III unas colonias de tipo (a''), que no crecen en las resiembras.

Estirpe número 44.

Se siembra en dos tubos, uno de Loewenstein pH 6 y otro de C. M. A.

En el primero aparecen abundantes colonias de tipo (b) o (b').

En el segundo no crece ninguna colonia.

Las colonias de tipo (b') aparecen en el tubo original, pero luego, en las resiembras, parece se convierten la mayoría en tipo (b).

Estirpe número 45.

Se siembra en dos tubos como la estirpe anterior número 44.

En el tubo Loew. pH 6 aparecen colonias de tipo (a'').

En el tubo C. M. A. aparecen escasas colonias de tipo (a').

Estirpe número 46.

Se siembra en dos tubos como la estirpe número 44.

En el tubo Loew. pH 6 aparecen colonias de tipo (a) y (b).

En el tubo C. M. A. aparecen unas colonias de tipo (a') sobre la sustancia lardácea sembrada.

Estirpe número 47.

Se siembra en dos tubos como la estirpe anterior número 44.

Aparecen colonias en un todo igual al anterior.

Estirpe número 48.

Se siembra en dos tubos de medio Loew. pH 6 y uno C. M. A.

En los dos primeros se observan colonias de tipo (a) y (a''). En el tubo III aparecen sólo escasas colonias de tipo (a').

Estirpe número 49.

Se siembran dos tubos en medio Loewenstein.

El tubo I da colonias típicas de tipo (a), pero, al ser resembradas, tan sólo aparecen colonias de tipo (a'').

En el tubo II aparecen unas pocas colonias de tipo (b).

Estirpe número 50.

Se siembran dos tubos en medio Loewenstein.

En el tubo I aparecen varias colonias tipo (a') y una sola de tipo Aspergillus.

En el tubo II aparecen varias colonias de tipo (a) y (a'').

Estirpe número 51.

Se siembran dos tubos en medio Loewenstein.

En el tubo I aparecen muchas colonias de tipo (b) y unas pocas sobre la sustancia lardácea de tipo (a').

Estirpe número 52.

Se siembran dos tubos, uno de Loew. y otro de C. M. A.

En el tubo I aparecen colonias de tipo (a'') y sobre la sustancia lardácea de tipo (a').

En el tubo II aparecen escasas colonias de tipo (a').

En resumen, podemos decir que de estas siembras de la serie 4.ª deducimos que en las realizadas sobre medio de Loewenstein sin colorante e incubadas a 25 grados, hay una clara tendencia a dar colonias de mohos del tipo Aspergillus. El medio de Czapeck-maltosa-agar, en cambio, resulta un medio de poca utilidad y en él crecen tan sólo las colonias de tipo (a') y alguna que otra de tipo (b). Las colonias de tipo (a') tienden a surgir sobre por-

ciones de folículos sembrados sin extender. Las colonias que con más frecuencia aparecen sobre el medio de Loewenstein, suelen ser las indefinidas de tipo (a''), aunque luego en las resiembras, muchas veces no dan cultivo. Repetimos que todas estas siembras se han incubado en los tubos originales a temperatura de 25 grados, y luego han sido resembradas a 37 grados, excepción hecha de las colonias de Aspergillus, que lo han sido siempre a 25 grados.

La frecuencia con que hemos visto aparecían sobre los folículos sembrados las colonias de tipo (a') nos indujo a realizar extensiones de los mismos y teñirlas luego mediante el May-Grünwald. Se puede ver que a los dos, tres cuatro y aun más días, unas pequeñas formaciones que se observan en los frotis de las granulaciones en fresco de un tamaño de una a tres micras, que suelen colorearse poco intensamente o no lo hacen en absoluto y quedan como granos refringentes en negativo entre otros teñidos, van transformándose más o menos lentamente en unos diplococos que van tomando cada vez mejor el colorante y cuya morfología es idéntica a los cocos que se observan en las colonias (a').

De esto hemos deducido que en las granulaciones, o al menos en su parte lardácea, hay unas formaciones que dan nacimiento a tales diplococos, pero que in vivo no tienen tal morfología en la lesión anatomo-patológica. El que sea durante los primeros días en que tal tejido ha sido separado del organismo y que entra en una necrosis más o menos rápida, nos permite suponer que sea alguna alteración que allí se produce la determinante de tal transformación. Entre diversos factores se conoce el estado de microaerobiosis que determina tal estado, que es el fundamento de los medios de cultivo de Tarozzi, para una serie de microorganismos que requieren una relativa baja tensión de oxígeno.

Raramente hemos observado formas microbianas del tipo (a) en los frotis de las granulaciones, y con alguna frecuencia sí hemos podido ver formaciones parecidas a las bacterias del tipo (b). De todas maneras, no cabe duda que la frecuencia de colonias que hemos descrito en los cultivos no corresponde, ni mucho menos, a la presencia de las formas microbianas correspondientes en el tejido patológico. Por tanto, y basándonos en lo antes expuesto para las colonias de tipo (a), hemos de creer que también estas formaciones microbianas tienen y proceden de formas no coincidentes en la granulación in vivo.

Por otra parte, las colonias de tipo (a'') y (b'), que casi son análogas en su morfología microbiana, hemos visto que, al menos, son de difícil resiembra y, sobre todo, nos han dado la impresión de que si lo conseguimos es para dar colonias que cada vez se parecen más a los tipos restantes, o sea, de las (a), (a') y (b). Los microorganismos correspondientes a estas colonias (a'') y (b'),

suelen tener un gran pleomorfismo. Durante mucho tiempo, por no admitir esta disociación y adaptación al medio, hemos realizado ímprobos esfuerzos para delimitar claramente estos tipos de colonias como correspondientes a especies distintas y bien definidas.

En las próximas publicaciones procuraremos explicar estos hechos.

RESUMEN

1) Se hacen consideraciones sobre los microrganismos que por microscopía se observan en las lesiones anatomo-patológicas del tracoma. Entre ellas se encuentran los corpúsculos de Halberstaedter y von Prowazek, los cuerpos ricketsiformes, nuestros corpúsculos de Rá, formas bacilares finas y otras correspondientes a bacilos grandes y bacilos capsulados. Hay un gran pleomorfismo.

2) Se han hecho siembras en distintos medios, pero especialmente en Loewenstein, sin colorante. En general, se aislan cinco tipos de colonias que llamamos (a) (a') (a'') y (b) (b'). De estas colonias, las (a'') y (b') tienen la particularidad de que están formadas por microorganismos altamente pleomórficos y no se consigue resembrarlas como tales, sino que cuando dan cultivo, las colonias son del tipo (a) (a') y (b).

Las colonias (a) suelen estar constituídas por una bacteria de morfología de las Corynebacteriaceae. Las colonias de tipo (a'), lo están por formas de Micrococcaceae, y las (b), por las correspondientes al género Bacillus.

3) En el medio dicho, y siempre que se cultive la siembra a 27°, en un 70 por 100 de casos aparecen colonias de un moho del tipo Aspergillus. Con gran frecuencia, estas colonias suelen crecer íntimamente mezcladas con las anteriores.

4) Se establece la hipótesis de que el microorganismo causante del tracoma, siendo único, tenga un gran pleomorfismo y qué las formas que se observan al microscopio correspondan a una sola especie, dependiendo su morfología del momento y situación en la lesión anatomo-patológica.

SUMMARY

1) Microorganisms are observed by the microscope in anatomo-pathological lesions of the trachoma. Among them are found the corpuscles of Halberstaedter and Prowazek, ricketsiform bodies, our Rá corpuscle, fine bacillary forms and others corresponding to large bacilli and capsulated bacilli. There is great pleomorphism.

2) Sowing in different media, especially in Loewenstein's without dye, was

carried out. Generally five types of colonies are separated, which are called (a) (a') (a'') and (b) (b'). Of these colonies (a'') and (b') differ in being formed by highly pleomorphic microorganisms and in that they cannot be re-sown with the same results, as the new cultures of these colonies are of the (a) (a') and (b) type.

The (a) colonies generally consist of a bacterium of Corynebacteriaceae morphology. The colonies of the (a') type consist of Micrococcaceae forms and those of (b) of bacteria corresponding to the genus Bacillus.

3) In the medium mentioned and provided the sowings are cultivated at 27° C., 70 % of them show colonies of Aspergillus fungi. Very frequently these colonies grow mingled with the previous colonies.

4) The hypothesis is assumed that since only one microorganism causes trachoma, it has a great pleomorphism and the forms observed under the microscope correspond to only one species, the morphology of which depends on the moment and situation in the anatomo-pathological lesion.

BIBLIOGRAFIA

(1) **SOCIAS, A.** 1936. Sobre el agente etiológico del tracoma y la presencia de ciertos elementos corpusculares en el granuloma tracomatoso. **Revista de Sanidad e Hig. Públ.**, I: 106-123.

(2) ——— 1941. De la presencia intranuclear de las inclusiones (corpúsculos de Rá) en el tracoma. **Rev. de Sanidad e Hig. Públ.**, V: 473-489.

ENSAYO MICROBIOLOGICO DE LA VITAMINA B_{12} CON EL L. LEICHMANNII.—INFLUENCIA DEL PH Y TEMPERATURA EN SU ESTABILIDAD

R. Préstamo.

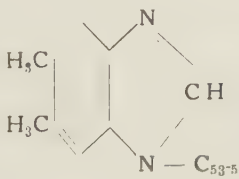
INTRODUCCION

Los trabajos de Shorh (17) demostraron que el Lactobacillus lactis Dorner (ATCC 8.000) necesita para su crecimiento dos factores no identificados; uno de los cuales, el factor L. L. D., está presente en los extractos hepáticos en concentraciones que guardan una estrecha relación con la potencia de los extractos en producir la remisión de la anemia perniciosa. Investigaciones posteriores (14) condujeron a la separación, a partir del hígado, de un compuesto cristalino rojo, vitamina B_{12}, que se identifica con el factor L. L. D. (18) y que, al parecer, es el responsable total o parcial de la actividad de los extractos hepáticos sobre el crecimiento del L. lactis Dorner.

Los caldos de cultivo de algunas estirpes de Mycobacterium smegmatis, L. arabinosus, B. subtilis, S. griseus, S. antibioticus y S. aureofaciens, presentan actividad para el L. lactis Dorner, habiendo logrado Rickes y colaboradores (15) aislar, a partir de una estirpe de S. griseus, productora de griseína, un compuesto de color rojo, que demuestra ser idéntico a la vitamina B_{12}, tanto por sus propiedades físico-químicas como biológicas.

La vitamina B_{12} cristaliza en pequeñas agujas de color rojo brillante, debido, según parece, a la presencia de cobalto en la molécula.

Cuando se trata con ácido clorhídrico 6 N a 150° durante dieciséis horas, se rompe la molécula, formándose un producto de fórmula empírica $C_9H_{10}N_2$, que resultó ser el 5,6-dimetil-benzimidazol, lo cual permite señalar la estructura provisional y parcial de la vitamina B_{12} de la manera siguiente:



$N - C_{53\text{-}54}\ H_{77\text{-}81}\ N_{12}\ O_3\ P\ Co$

La estabilidad de la vitamina B_{12} varía con el pH del medio, destruyéndose rápidamente en solución alcalina, pasando del color rojo al naranja y, finalmente, al marrón. En relación con el tiempo de contacto (15), una solución de vitamina B_{12} en sosa 0,015 N se inactiva (ensayo microbiológico) a la temperatura ambiente en la siguiente forma: 20 por 100 en 0,67 horas; 45 por 100 6 horas; 90 por 100 en 23 horas, y 95 por 100 en 95 horas. En medio ácido la estabilidad aumenta, aunque se inactiva también en solución ácida fuerte; así, en solución de ácido clorhídrico 0,01 N se inactiva en las proporciones de: 18 por 100 en 3 horas; 75 por 100 en 23 horas, y 89 por 100 en 95 horas.

Una revisión completa de este importante factor antianémico ha sido publicada por J. M. Alonso y R. Préstamo (1).

No encontrándose en la literatura datos sobre la estabilidad de la vitamina B_{12} a distintos pH en relación con la temperatura, hemos creído conveniente fijar estas condiciones en el presente trabajo.

Los métodos de ensayo microbiológico utilizados en la valoración de la vitamina B_{12}, podemos clasificarlos en: a) métodos turbidométricos o volumétricos (2, 20, 13, 9, 3, 8, 10); b) método de pocillos (6-4); c) métodos cromatográficos (22, 23, 12,5), y d) otros métodos (7 y 11).

En el presente trabajo utilizamos el método turbidométrico, y como organismo de ensayo, el Lactobacillus leichmanii (ATCC 4.797), que no presenta las desventajas del L. lactis Dorner (4, 22, 23, 12,5, 7, 11, 10).

PARTE EXPERIMENTAL

Técnica utilizada.

a) **Medio basal.**—Es una modificación del descrito por Snell (21) y tiene la composición siguiente:

	Cantidades para 500 c. c. de medio a concentración doble	
Glucosa anhidra	10	gr.
Acetato sódico anhidro	10	»
Hidrolizado ácido de caseína (1)	5	»
Asparragina	0,1	»
L-triptofano	0,1	»
L-cistina	0,2	»
Tioglicolato sódico	0,2	»
Tween 80	1	c. c.
PO_4HK_2	1	gr.
PO_4H_2K	1	»
$SO_4Mg\ 7H_2O$	0,4	»
$SO_4Fe\ 7H_2O$	20	mgs.
$SO_4Mn\ 4H_2O$	20	»
Adenina	10	»
Guanina	10	»
Uracilo	10	»
Xantina	10	»
Acido para-aminobenzoico	2,5	»
Biotina	0,005	»
Acido fólico	0,01	»
Acido nicotínico	1	»
d-pantotenato cálcico	0,20	»
Piridoxina	0,20	»
Piridoxal	0,40	»
Clorhidrato de tiamina	0,50	»
Lactoflavina	0,80	»

Antes de la adición del tioglicolato sódico se ajusta el pH del medio 6,8-6,9, se calienta hasta que el precipitado flocule, y se filtra. El tioglicolato sódico se añade poco antes de la esterilización, ajustando el pH a 6,8-6,9.

b) **Conservación de la estirpe.**—El cultivo del stock del L. leichmannii (ATCC 4.797) se mantiene en un medio de la siguiente composición:

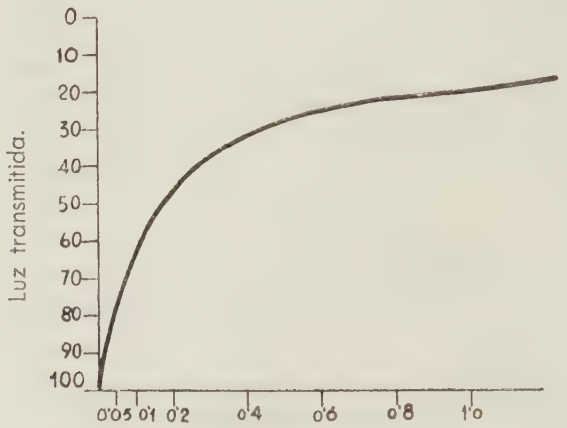
Leche desnatada	1.000	c. c.
Jugo de tomate (no clarificado)	100	»
Extracto de levadura	5	gr.
pH final	6,5	»

(1) 100 grs. de caseína se hidrolizan con 200 c. c. de ácido sulfúrico al 25 por 100 durante 20 horas en el autoclave a 120°. El producto de hidrólisis se neutraliza a pH 3 con hidróxido cálcico; se filtra y trata con 5 grs. de carbón activo por cada 100 c. c. a ebullición durante 45 minutos; se filtra y lleva a pH 7 con hidróxido cálcico, y, finalmente, nueva filtración y evaporación a sequedad en el vacío.

c) **Inóculo.**—Un cultivo en leche de 24 horas se trasplanta a 10 c. c. de medio basal (sin tioglicolato sódico) que contiene extracto hepático purificado equivalente a 9 000 grs. de hígado fresco por litro de medio de concentración simple. Este tubo se incuba 24 horas a 37°, se centrifuga y las células se resuspenden en 60 c. c. de solución salina estéril.

d) **Solución standard.**—Se prepara a partir de vitamina B_{12} cristalizada.

e) **Procedimiento de valoración.**—El ensayo se lleva a cabo en tubos de 18 × 150 mm., con un volumen total de 10 c. c. de medio. La curva standard de crecimiento se obtiene a partir de la solución standard, empleando concentraciones que varían de 0,05 a 1 milimicrogramo de vitamina B_{12}. La solución



Respuesta del L. leichmannii a la vit. B_{12} cristalizada.

problema se diluye hasta operar con concentraciones aproximadas a la standard. A cada uno de los tubos, con la solución problema y standard, se les completa a 5 c. c. con agua destilada, se añaden 5 c. c. de medio basal y se esteriliza a 120° durante 10 minutos. Después de la esterilización se inocula cada tubo con una gota de la suspensión del L. leichmannii en solución salina estéril.

Después de incubar 40 horas a 37°, se mide la turbidez en el fluorofotómetro de Pfaltz-Bauer, calculando el contenido en vitamina B_{12} de la solución problema, por referencia a la curva standard.

Si han de hacerse varios ensayos de una muestra, debe conservarse ésta en estado de congelación hasta el momento del ensayo; de igual forma se conservará la solución standard de vitamina B_{12}.

Preparación del material de ensayo.

Una cantidad exactamente pesada de vitamina B_{12} cristalizada se disuelve en solución salina, se toman partes alícuotas y se completan con las soluciones tampón de fosfatos de pH cuya influencia tratamos de investigar, a un volumen determinado, para conseguir una concentración final de 15 γ de vitamina B_{12} cristalizada por c. c. Las soluciones tampón de fosfatos se prepararon de la forma siguiente:

$PO_4 H_2 K$ 9 grs./1.000 c. c.	$PO_4 HNa\ 2H_2O$ 11,87 grs./1.000 c. c.	pH
29,7 c. c.	0,3 c. c.	5
27 »	3 »	6
12 »	18 »	7
0,75 »	29,25 »	8

Las soluciones finales se envasan en ampollas de 2 c. c., separando de cada solución tres lotes que se esterilizan a distintas temperaturas:

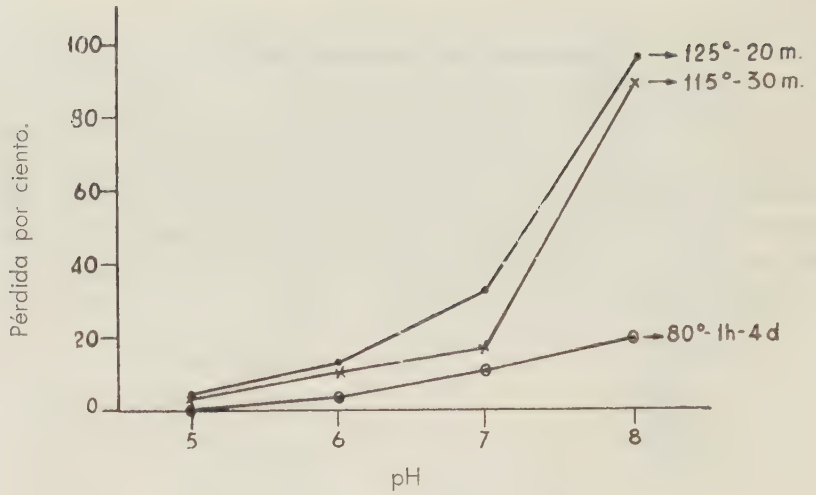
1) A 80° en baño María durante una hora, cuatro días.
2) A 115° durante treinta minutos.
3) A 125° durante veinte minutos.

La solución standard (en solución salina sin esterilizar) se conserva en estado de congelación. Todas estas soluciones problemas, después de la esterilización presentan un intenso color rojo-violeta, excepto las de pH 8 sometidas a 115° y 125°, que toman un color anaranjado.

Resultados obtenidos.

Valores medios de cuatro valoraciones en soluciones que contienen 15 γ de B_{12} por c. c. (P = pérdidas por 100).

	80° — 1 h. 4 d.	115° — 30 m.	125° — 20 m.
pH 5	15 γ/c. c. (P = 0)	14,5 γ/c. c. (P = 3,3)	14,4 γ/c. c. (P = 4)
pH 6	14,6 γ/c. c. (P = 2,8)	13,45 γ/c. c. (P = 10,5)	13,05 γ/c. c. (P = 13)
pH 7	13,25 γ/c. c. (P = 11,5)	12,45 γ/c. c. (P = 17)	10,05 γ/c. c. (P = 33)
pH 8	12 γ/c. c. (P = 20)	1,8 γ/c. c. (P = 88)	0,75 γ/c. c. (P = 95)



Pérdidas de vit. B_{12} a distintos pH y temperaturas.

COMENTARIOS

Con el método turbidométrico utilizado, el error experimental es, aproximadamente, de ± 10 por 100, necesitando el L. leichmannii (ATCC 4.797) una incubación de 40 horas a 37° para alcanzar el máximo crecimiento.

Los resultados conseguidos muestran que el pH óptimo para la estabilidad de las soluciones de vitamina B_{12}, está comprendido entre 5 y 6, siendo el pH 5 a 5,5 el indicado para la preparación de medicamentos inyectables.

Las soluciones a pH 7 sufren sensible pérdida (17 por 100) cuando se esterilizan a 115° 30 minutos, y casi el doble cuando se someten a 125° 20 minutos.

La vitamina B_{12} en solución a pH 8 es muy inestable, alcanzando las pérdidas el 88 y 95 por 100 cuando se esterilizan a 115° 30 minutos y 125° 20 minutos, respectivamente, virando el intenso color rojo al anaranjado.

Cuando la temperatura de esterilización es baja (tindalización a 80°) las pérdidas de actividad son mucho menores, alcanzando el 20 por 100 en las soluciones a pH 8.

RESUMEN

Utilizando el método biológico del L. leichmannii en las condiciones descritas en este trabajo, se han obtenido los siguientes resultados:

1) El pH óptimo para las soluciones de vitamina B_{12} está comprendido entre 5 y 6.

2) Las soluciones a pH 7, cuando se esterilizan a 125° pierden el 33 por 100 de su actividad.

3) Las soluciones a pH 8 pierden el 90 por 100 de su potencia cuando se esterilizan a 115° y 125°.

4) Cuando la esterilización se efectúa por tindalización (80°), la pérdida es mucho menor, siendo a pH 8, del 20 por 100.

SUMMARY

With the biological method of the L. leichmannii, under the conditions described in this paper, the following results were obtained:

1) The optium pH for solutions of vitamin B_{12} ranges from 5 to 6.

2) Solutions of pH 7 lose 33 % of their activity on sterilizing at 125° C.

3) Solutions of pH 8 lose 90 % of their capacity when sterilized at 115 and 125° C.

4) When sterilization is carried out by tindalization (80° C.) the loss is considerably less, being 20 % at pH 8.

BIBLIOGRAFIA

(1) ALONSO, J. M., y PRESTAMO, R. 1949. Monitor de la Farmacia: 343.
(2) CAPPS y cols. 1949. J. Biol. Chem., 178: 517.
(3) CASWELL y cols. 1949. J. Biol. Chem., 180: 125.
(4) CUTHBERTSON. 1949. Biochem. J., 44. Proc. v.
(5) ——— y SMITH. 1949. Biol. J., 44. Proc. v.
(6) FOSTER y cols. 1949. Science, 110: 507.
(7) FROST y cols. 1949. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72: 102.
(8) GREENE y cols. 1949. J. Biol. Chem., 178: 999.
(9) HOFFMANN y cols. 1948. J. Biol. Chem., 176: 1.465.
(10) ——— y cols. 1949. J. Biol. Chem., 181: 635.
(11) HUTNER y cols. 1949. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70: 118.
(12) JACOWITZ y NORRIS. 1949. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71: 372
(13) KOCHER. 1949. Inter. Zeist. Vit., vol. 20: 369.
(14) RICKES y cols. 1948. Science, 107: 396.
(15) ——— y cols. 1948. Science, 108: 634.
(16) ——— y cols. 1949. Science, 108: 134.
(17) SHORB. 1947. J. Biol Chem., 169: 455.
(18) ——— 1948. Science, 107: 397.
(19) ——— y BRIGGS. 1948. J. Biol. Chem., 176: 1.463.
(20) SKEGGS y cols. 1948. J. Biol. Chem., 176: 1.459.
(21) SNELL y cols. 1948. J. Biol. Chem., 175: 473.
(22) WINSTEN y EIGEN. 1949. J. Biol. Chem., 177: 989.
(23) ——— y OSER. 1949. 116th Meeting Am. Chem. Soc.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL Y APLICADA
SECCION DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL PATRONATO JUAN DE LA CIERVA
C. S. I. C.

POSIBILIDAD DE FABRICAR LEVADURAS PRENSADAS SOBRE PREHIDROLIZADOS DE RESIDUOS AGRICOLAS

Juan Marcilla Arrazola y Luis Hidalgo Fernández-Cano.

La totalidad de la levadura prensada que se fabrica en España se obtiene a partir de las melazas de azucarería, con procesos de aireación por burbujas.

Los elevados precios de las melazas de remolacha, el kilogramo de azúcar en ellas contenido oscila alrededor de las cuatro pesetas, y el rendimiento en levaduras con el proceso de multiplicación usual, muy inferior a cuarenta y cinco partes de levadura seca por cada cien partes de azúcar consumido (que representa no menos del 95-96 por 100 del azúcar puesto en juego), nos hicieron pensar sobre la conveniencia y posibilidad de sustituir parcialmente a las melazas de azucarería por otro substrato, más económico e igualmente o con ventaja utilizable en la industria española de levaduras prensadas, permitiendo que aquéllas se destinen a las industrias de fermentación y a la cabaña nacional, que se beneficiarían si pudieran disponer de piensos melazados.

Las melazas no son un medio óptimo para la proliferación de los s a c c h a r o m y c e s; escasean los compuestos nitrogenados asimilables por las levaduras y ciertos otros metabolitos esenciales; la salinidad no es la más adecuada y es preciso eliminar compuestos nocivos a la multiplicación de las levaduras o a la presentación adecuada de las mismas.

El acondicionamiento integral de las melazas debería comprender no sólo la depuración y adiciones usuales, sino, también, la mezcla con mostos de gramos o extractos de malta, mezclas que en nuestro país no sólo resultarían costosas, sino, a veces, imposibles.

Como causas principales del escaso rendimiento que se obtiene en las levaduras prensadas, podemos apuntar la menor eficacia de la aireación forzada, en forma de burbujas relativamente gruesas, en comparación con la aireación nebulizada que se emplea corrientemente en la fabricación de levaduras alimenticias, y más aún con la obtenida en cubas, como las de Waldhof, en las que todo líquido está mantenido, por aireación y agitación simultáneas, en forma de espumas, y, en conexión con esta primera causa, la pérdida que supone la transformación fermentativa de parte del azúcar en alcohol.

Aun suponiendo que se lograra el ideal de que la porción de alcohol no exceda de 0° 2, consumimos sin provecho unos 3,5 gramos de azúcar por cada litro, pero como frecuentemente se llega al final del proceso con un grado alcohólico igual o superior a 1°, la porción de azúcar derrochada es de 17 gramos o más, es decir, pasa del 35 por 100 si la concentración fué del 5 por 100. En las fabricación de levaduras alimenticias se hacen proliferar especies y razas de muy escaso o nulo poder fermentativo, con exigencias mínimas en microfactores y metabolitos esenciales.

Aunque no está, ni con mucho, resuelta la sustitución cuya posibilidad sugerimos, creímos interesante comunicar al XXII Congreso Internacional de Química Industrial, celebrado en Barcelona los días 23 al 30 de octubre de 1949, los resultados que hemos obtenido como consecuencia del estudio de diversas materias primas nacionales que pueden servir para la preparación de caldos dedicados a la proliteración de levaduras. Entre otras materias primas, los carozos (mazorcas desgranadas) y aun las cañas secas residuales del cultivo del maíz nos han servido para la obtención:

a) De prehidrolizados resultantes de las acción a 80° de temperatura de diluciones de ácido sulfúrico al 3 por 100 en peso, obtenidos por un sencillo proceso de difusión.

b) De un residuo rico en lignina y en celulosa, sacarificable la última para obtener, por un método en gran parte original, glucosa técnica. El tema de la presente comunicación no permite nos ocupemos de este aprovechamiento.

Respecto a los prehidrolizos, apuntaremos que, después de una difusión en cuatro elementos, con una hora de contacto entre sólido (molido groseramente) y líquido ácido, la concentración de materias reductoras del Fehling llega a ser de 120 a 140 gramos por litro (expresado en glucosa), principalmente xilosa y ácidos urónicos.

El nitrógeno formol, indicador aproximado del nitrógeno asimilable por las levaduras, es lo suficientemente elevado para permitir la proliferación de la *Torulopsis utilis*, *Candida pulcherrima*, n. var. *liquefaciens* (Marcilla y Feduchy) y de una estirpe de *Oidium lactis*, que por el momento son las destinadas a multiplicación, sobre prehidrolizados diluídos, sin otra adición que la de pequeña proporción de fosfatos monocálcico o dipotásico, aunque el incremento del peso en materia seca del conjunto de levadura es sensiblemente más lento que cuando se añaden a los prehidrolizados cantidades adecuadas de sales amónicas o urea.

Aun cuando las levaduras alimenticias que cultivamos son susceptibles de crecer en medios estrictamente minerales, salvo la sustancia ternaria que sirve de alimento energético y plástico carbonado, sin embargo, los rendimientos industriales obligan, cuando se trata de prehidrolizados de residuos agrícolas, a la adición de determinados metabolitos contenidos en los autolizados de levadura, corn-steep, o preparados análogos, en proporción suficiente para influir

en la mejor nutrición carbonada nitrogenada de las levaduras. Los resultados por nosotros logrados en la multiplicación de la *Torulopsis utilis*, *Candida pulcherrima* y *Oidium lactis* son algo mejores con el corn-steep y con un preparado análogo a partir de la avena (al que llamamos avena-steep) que con agua o extracto de levadura, pero no es seguro que no influyan las diferentes concentraciones de metabolitos que no son, en rigor, microfactores.

No creemos que los prehidrolizados de carozos de maíz estén exentos de todos los microfactores de crecimiento hasta hoy conocidos como indispensables para la proliferación de los *Saccharomyces* industriales, y más o menos útiles para las levaduras alimenticias que cultivamos como principal finalidad de nuestras investigaciones. Sin embargo, contienen furfural, y quizás otros cuerpos tóxicos, inhibidores del crecimiento de la levadura, tales como unas sustancias fácilmente oxidables, las cuales, por aireación, dan origen a floculaciones de color pardo negruzco o negro algo rojizo y cuya formación en cantidad apreciable impide la proliferación de las células o la reduce muy notablemente.

Fijados por una larga serie de investigaciones sistemáticas (que pronto esperamos poder publicar) las condiciones óptimas del medio para la multiplicación de levaduras alimenticias, pasamos a estudiar si el substrato es utilizable para la obtención de levaduras prensadas sin demérito de sus calidades.

Substratos para la multiplicación.—A) Melazas de azucarería, preparadas según F. G. Walter, 1941, «The manufacture of Compressed Yeast», Chapman & Hall, Londres. (Método al fosfato cálcico.)

B) Prehidrolizado de carozos de maíz parcialmente neutralizado con lechada de cal, hasta pH = 4,5-5,0, filtración para separar el sulfato cálcico y dilución hasta que la concentración de materias reductoras del Fehling sea igual a 2 por 100 (peso-volumen). Adición de 0,13 gramos de PO_4K_2H por cada 100 centímetros cúbicos de caldo (exceso de PO_4) y de sulfato amónico en cantidad equivalente a la adición de 0,06 gramos de NH_3 por cada 100 c. c. de prehidrolizado diluído. Nuevo ajuste del pH a 4,5-5,0 (papel indicador universal Merck). Esterilización a 100° (vapor fluyente) durante media hora.

Siembras.—Levadura prensada danesa, procedente de los «Carlsberg Laboratories» (Copenhague), en cultivo puro.

Aireación.—Por burbujeo de aire (esterilizado por lavado en dicromato potásico y filtro de algodón) que sale por capilares con un gasto de 20 litros a la hora.

Tiempo de multiplicación.—Veinte horas a 30°.

Tiempo de maduración.—Diez horas a la temperatura ambiente (25°-26°).

Los resultados obtenidos, cuyos detalles serán publicados en los Anales del ya citado Congreso de Química Industrial, pueden ser resumidos como sigue:

Conteo de levaduras al final de la experiencia:

$$\frac{\text{sobre melazas}}{\text{sobre prehidrolizado}} = 1{,}002.$$

Tamaño de las células de levadura-cosecha:

Longitud: $\dfrac{\text{sobre melazas}}{\text{sobre prehidrolizado}} = 0{,}980.$

Anchura: $\dfrac{\text{sobre melazas}}{\text{sobre prehidrolizado}} = 1{,}027.$

Materia seca de levadura cosechada en 100 c. c. (siembra + proliferación):

$$\frac{\text{sobre melazas}}{\text{sobre prehidrolizado}} = 1{,}007.$$

Poder fermentativo de las levaduras cosechadas (fermentómetro de Van Iterson y Kluyver):

Tiempo transcurrido desde la siembra — Horas	C. C. con levaduras sobre melazas / C. C. con levaduras sobre prehidrolizados
2	0,983
3	1,011
4	1,009
5	1
15	1
25	1

Como puede apreciarse, la multiplicación de las levaduras prensadas sobre prehidrolizados de carozos de maíz es satisfactorio, aunque, en una primera fase, es más lenta que la lograda sobre melazas (observación que no queda reflejada en los datos anotados, que son los finales después de una larga aireación). El poder fermentativo de las levaduras es idéntico para las cosechadas sobre melazas y sobre prehidrolizados, y tampoco hay diferencia en forma y tamaño.

No puede aún deducirse con fundamento ninguna conclusión acerca de los rendimientos en levadura de las materias reductoras consumidas en cada tipo de substrato, porque las materias reductoras contenidas en los prehidrolizados ni tienen igual poder reductor que la glucosa y levulosa, ni, probablemente, constituyen la totalidad de las materias ternarias que son asimilables por las levaduras en los prehidrolizados. Parece, sin embargo, a primera vista (y ello es lógico), que los rendimientos en levadura son mayores sobre el azúcar invertido, la sacarosa y rafinosa de las melazas que sobre la xilosa, ácidos urónicos complejos y otras sustancias ternarias contenidas en los prehidrolizados.

Nuestra experiencia marca sólo una primera orientación, pero demuestra

el hecho interesante de que pueden ser logradas, sobre prehidrolizados, levaduras prensadas de análogo aspecto e idéntico poder fermentativo al de las obtenidas sobre melazas, sin que en este caso deban ser temidas las pérdidas de cosecha de levaduras debidas a la formación de alcohol.

Igual éxito inicial podría ser obtenido, seguramente, si se adoptase como substrato el jugo de los tubérculos de gamonitas o gamones, nombres vulgares de las dos especies de Asphodelus, albus y microcarpus, plantas espontáneas extraordinariamente abundantes en España. En investigaciones de Marcilla y Feduchy, y en escala de pequeña industria, se ha demostrado la utilidad de los citados jugos para la fabricación de alcohol etílico, con fermentaciones extraordinariamente fáciles. Para la fabricación de levaduras prensadas los problemas serían: eliminación previa del pigmento amarillo que existe en los tubérculos y en sus zumos, se fija sobre las levaduras, a las que tiñe, y quizá también el de evitar, en dichas levaduras, un ligero sabor áspero-amargo, propio de los mismos jugos, problemas que no parecen demasiado difíciles de resolver mediante adecuados procesos de depuración de los substratos.

Los jugos de tubérculos de la pataca (Helianthus tuberosum) son, análogamente, después de suave hidrolisis de la inulina (polisacárido que constituye su material hidrocarbonado de reserva), aptos para la fabricación que nos ocupa.

RESUMEN

Se aborda el problema de la sustitución, en la fabricación de levaduras prensadas, de las melazas de azucarería por otros substratos en los que las materias ternarias asimilables por los Saccharomyces puedan resultar más económicas que los azúcares contenidos en aquéllas, a los precios actuales de las mismas, en España, y, además, ofrezcan determinadas ventajas de orden técnico.

Se demuestra experimentalmente la posibilidad de obtener sobre prehidrolizado de carozo de maíz (mazorcas desgranadas), levaduras prensadas de idéntica presentación y poder fermentativo que las cosechadas en cultivo sobre melazas.

Se apuntan las probables posibilidades de otras materias primas para esta fabricación.

Las investigaciones realizadas hasta el día representan sólo una iniciación y están todavía muy lejos de resolver la cuestión, pero, por ello, se sugiere la conveniencia de continuarlas.

SUMMARY

The authors bring out the problem of the substitution in the manufacture of pressed yeasts, of the sugar molasses by other substratum in which the ternary substances assimilable by the Saccharomyces could be more economical than the sugar contained in the molasses at their present price in Spain, and could offer besides some technical advantages.

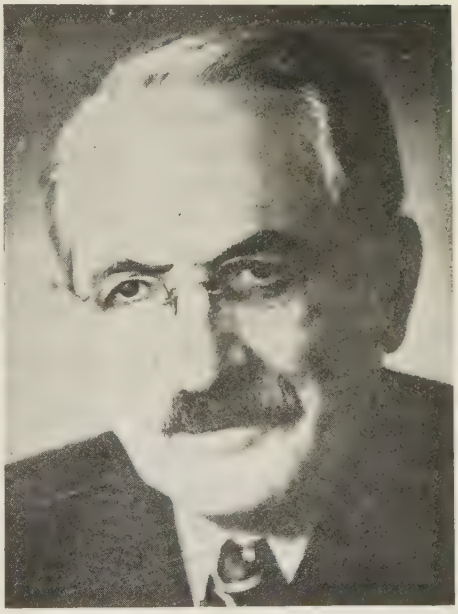
The possibility of obtaining on prehydrolization of cob of maize (grainless ear) pressed yeasts of an identical presentation and fermentative power than those obtained by cultivation on molasses is experimentally demonstrated.

The probable possibilities of other raw materials for this manufacture are also mentioned.

The researches performed up to thid time represent only an initiation and are still very far from the solution of the question. Therefore the convenience of carrying out further experiments is suggested.

INFORMACION

ESTANCIA DEL PROFESOR WAKSMAN



En el curso de su reciente viaje a nuestra Patria, permaneció unos días en Madrid, el pasado mes de abril, el Profesor Selman A. Waksman, de la Universidad de Rutgers (E. U. A.). Entre los diversos actos en que tomó parte durante la estancia citada destacan la conferencia pronunciada por él en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y su investidura de Doctor H o n o r i s C a u s a, por la Universidad de Madrid.

El primero de dichos actos, organizado por la **Sociedad de Microbiólogos Españoles** y el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal del C. S. I. C., tuvo lugar el 18 de dicho mes, en el Salón de Actos de la sede central del Consejo, y ocupando la mesa presidencial los Profesores Casares Gil, Albareda, Vilas y Socías, juntamente con el conferenciante.

Abierta la sesión, el Profesor Vilas pronunció unas palabras realzando la labor de Waksman en el campo de la Microbiología del suelo, labor que tan útil le fué para sus trabajos posteriores sobre antibióticos, e hizo constar el acuerdo de la Sociedad de nombrarle M i e m b r o d e H o n o r. Seguidamente, el ilustre huésped, tras agradecer la distinción recibida, desarrolló el tema «Investigación de nuevos agentes quimioterápicos»—recogido al principio de este mismo número—, terminando el acto con la imposición, por el Profesor Ca-

sares Gil, de la Medalla de Consejero de Honor del Consejo Superior de Investigaciones Científicas al Profesor Waksman.

El día 21 tuvo lugar el segundo de los actos indicados, en el Paraninfo de la Universidad. Presidió el excelentísimo señor Ministro de Educación Nacional, don José Ibáñez Martín, quien tenía a su derecha al Profesor Waksman, y a su izquierda al Rector Magnífico de la Universidad, don Pío Zabala. En la mesa presidencial se encontraban también los Decanos de las distintas Facultades. Gran número de profesores y otras personalidades y de estudiantes ocupaban el resto del Paraninfo.

Abierto el acto por el excelentísimo señor Ministro, el Secretario General de la Universidad, Profesor Ferrandis, dió lectura al acta en que se nombra Doctor Honoris Causa al Profesor Waksman. A continuación, el Catedrático de Bacteriología de la Facultad de Ciencias, Profesor Socías Amorós, pronunció el discurso protocolario de presentación, como padrino del doctorando. Seguidamente, el Decano de la Facultad de Ciencias, Profesor San Miguel de la Cámara, juntamente con el Vicedecano, Profesor Ipiens, y el Catedrático de Fisiología Vegetal de la citada Facultad, Profesor Bustinza, invistieron con toga y muceta al Profesor Waksman. Leído por éste su discurso de gracias, en español, el excelentísimo y Magnífico señor Rector le impuso, bajo el severo protocolo establecido, el birrete, anillo y guantes, haciéndole entrega del simbólico libro de la Ciencia, con el abrazo de hermandad.

Por último, y entre el cordial homenaje del público puesto en pie, fué impuesta al nuevo Doctor, por el excelentísimo señor Ministro, la áurea Medalla de la Universidad.

En las páginas siguientes reproducimos el discurso del Profesor Socías y el del Profesor Waksman.

Discurso del Profesor Socías.

Excelentísimo señor Ministro, excelentísimo y Magnífico señor Rector, excelentísimos e ilustrísimos señores, señoras y señores:

No en vano me embarga la emoción en estos momentos en que, por designación de este Claustro de Profesores, he sido encargado del inmerecido honor de presentar los relevantes méritos que, al concurrir en la persona del sabio Profesor Waksman, le hacen acreedor a la investidura de Doctor H o n o r i s C a u s a de la Universidad Matritense.

Bien me doy cuenta que serán escasas las nuevas aportaciones que para el mejor conocimiento de la personalidad científica del ilustre sabio pueda daros, puesto que su fama es ya ecuménica.

Sólo me permitiré señalar brevemente ciertas facetas de interés para nuestra vida docente, que sirvan de estímulo y enseñanza a los que caminamos por los áridos senderos de la ciencia y, a la vez, de ejemplo perenne para nuestras juventudes universitarias.

Finalizaba el siglo XIX a la vez que daba sus primeros vagidos lo que había de ser luego la época clásica de la ciencia bacteriológica. Allá en la noble soledad de la estepa ucraniana, en el regazo amoroso de la aldea de Priluca, nacía en un día de julio del 88 Selman A. Waksman.

Su educación—del tipo de nuestro bachillerato—la llevó a cabo en el Gymnasium de la ya meridional Odessa. La intuición, que toda su vida será su rectora, le orienta a emigrar a los Estados Unidos de América con el ansia de ilimitados horizontes; así fué como a los veintidós años se encuentra en Nueva Jersey, en la Facultad de Agricultura de la Universidad de Rutgers.

Desarrolla sus estudios influido por las cordiales relaciones de otro emigrado ruso: el Profesor J. G. Lipman. Y como Waksman de antemano había decidido polarizar sus estudios hacia la biología, bajo tal influjo lo hace particularmente en la Microbiología del suelo.

Recibe en 1915 el título de «Bachelor of Science», y es nombrado asistente de la «Agricultural Experimental Station», de New Jersey.

En 1916 obtiene el título de «Master of Science» por la citada Universidad y es nombrado colaborador de la de California, donde en 1918 obtiene el título de Doctor. Mientras tanto, acepta una beca con los Profesores H. B. Robertson y G. N. Lewis en este último centro docente, con el fin de estudiar Bioquímica

y Físicoquímica, conocimientos que en un futuro próximo tan valiosos le han de ser.

Progresivamente es nombrado en 1925 Profesor adjunto y en 1930 Catedrático de Microbiología en la Universidad Rutgers, de New Jersey. Actualmente es, además, Jefe del Departamento de Microbiología de la Estación Agrícola Experimental.

El Profesor Waksman, en 1931 es encargado de crear una Sección de Bacteriología Marina en el Instituto Oceanográfico de Woods Hole, en California. Es en la misma California donde contrae matrimonio con Miss. Mitnik, estudiante de primer curso y hermana de su mejor amigo en el pueblo natal; en ella encontrará, en su futuro caminar, la esposa amante y la colaboradora eficaz.

Ya en sus tiempos de estudiante es atraído por la investigación de los actinomicetos del suelo, dando cima con ello, en 1919, a sus primeras publicaciones, que aparecen en la revista **Soil Science** bajo el título «Cultural studies of species Actinomycetes»; otro, titulado «Studies in the methabolism of the Actinomycetes», ve la luz en el **Journal of Bacteriology.**

Su intenso trabajo—que asombra—unido a una clara inteligencia, le permite en tan poco tiempo ser capaz de escribir su gran obra titulada «Principles of soil microbiology», cuya primera edición, con más de 800 páginas, apareció en 1926, y la segunda en 1931. Tan sólo hace dos días, me decía el Profesor Waksman que, estando agotada, no se puede en la actualidad reeditar.

En 1942 escribe otro libro de interés excepcional: «The soil and the Microbe».

Waksman tiene el gran mérito de valorizar la Biología del suelo, de considerarlo como un mundo viviente, no como algo inerte; la gran entraña de la tierra no está enseñoreada por lo mineral, sino que la vida palpita dando pábulo a todo lo organizado. Así, lleva a cabo su estudio que aparece luego en el libro «Humus», impreso en 1936.

Su autoridad a este respecto, es causa de que, en 1932, el Director de Investigación de la «National Tuberculosis Association» se entreviste con él para un asunto concreto: el destino del bacilo tuberculoso una vez en el suelo. Según esta idea directriz se hacen experiencias, no sólo sobre el bacilo de Koch, sino aun a través de múltiples bacterias, tanto en el suelo como en el agua de las alcantarillas, para llegar a la conclusión—conforme con otros autores y experiencias anteriores—de que su supervivencia es corta. Puede decirse que estos son sus primeros pasos en el terreno de la microbiología de patógenos, que le serán muy valiosos para sus futuros trabajos en antibióticos, ya que Waksman comprende y ve con clarividencia la importancia de los microorganismos del suelo en la destrucción de las bacterias patógenas.

Waksman establece por primera vez la denominación de antibióticos universalmente aceptada, para designar «aquellos productos del metabolismo de los microorganismos que tienen la capacidad de inhibir y aun destruir la vida de las bacterias, en especial de las patógenas». Así es como en 1939 se lanza

plenamente a la investigación de tales productos entre los actinomicetos, que en su pretérita labor había aislado, clasificado y estudiado.

En este año sólo, se conocen dos antibióticos—la Actinomicetina y Actinomyces-lisozima—que no son exactamente de tal naturaleza y que derivan de un gran número de actinomicetos.

Una comisión de expertos—médicos, químicos y biólogos, y entre ellos Waksman—se reúne en 1941 para discutir los caminos más apropiados para abordar el problema de la tuberculosis mediante la quimioterapia. La mayoría son del parecer de buscar enzimas o fermentos que disuelvan la coraza cérea del agente etiológico, y es Waksman quien impone su criterio de que un fermento de tan enérgica naturaleza ha de ser a la vez nocivo para las células del organismo que lo alberga, y, en consecuencia, propone buscar una sustancia que interfiera las reacciones metabólicas, bien de la síntesis, bien de la reproducción del bacilo. O sea, en otras palabras: propone buscar un antibiótico de acción bacteriostática o bactericida.

En este mismo año de 1941, aisla la estreptotricina, que, resultando de gran interés por su eficacia ante las bacterias Gram-negativas, pierde en cambio su utilidad, por su efecto tóxico retardado.

Dos años más tarde, descubre la estreptomicina. Esta sustancia tiene la gran ventaja sobre la penicilina de Fleming, de ser activa sobre las bacterias Gram-negativas, al igual que la anterior, y, además, sobre las ácido-resistentes, como el bacilo de la tuberculosis.

Este descubrimiento lo llevó a cabo con sus colaboradores Albert Schatz y Elisabeth Bugie, en el Actinomyces griseus.

La labor colosal que desde entonces ha desarrollado en el campo de los antibióticos, sólo se comprende diciendo que en este lapso de siete a ocho años ha estudiado más de 50.000 cultivos y de ellos aisló varios nuevos productos de tal índole, siendo los más recientes la neomicina y la fradicina, que actualmente están sufriendo las pruebas para determinar su eficacia, potencialidad e inocuidad, ante la enfermedad y el enfermo, y que parecen ser mucho más útiles que la estreptomicina.

Podemos afirmar que desde el descubrimiento por Fleming del primer antibiótico—la penicilina—los más importantes productos de esta naturaleza han surgido de la familia de las Actinomycetales, y que su número no es menor de treinta.

La importancia de la estreptomicina ha saltado las barreras de la técnica bacteriana y médica, para que hoy sea conocida del público no especializado; y es que no en vano va dirigida su acción terapéutica contra uno de los más terribles azotes de la humanidad que le quedan al hombre aún por yugular en este siglo de gestas gloriosas contra las enfermedades infecto-contagiosas: la tuberculosis. El tributo que ha pagado el género humano al bacilo de Koch es pavoroso, y con la estreptomicina se ha dado un gran paso en su ataque.

En la historia de la ciencia pura microbiológica, es indiscutible que Waksman marca claramente un hito, aunque es precisamente en el campo de los antibióticos donde nuestro doctorando es conocido mundialmente y su fama ha sido bien ganada; pero este nombre es del tipo de lo popular, donde tanto interviene la moda y la actualidad. Es este algo fácil, cuando un nombre se hace familiar al oído radioyente, al que basa sus conocimientos científicos en los periódicos y en la asistencia a tantas y tantas conferencias científicas de más o menos divulgación. Hoy existe el tipo de persona que adquiere unos conocimientos que le hacen apto para discutir y hasta hacer un brillante papel en la tertulia de café o reunión de sociedad; que para tal fin no es menester—y él lo sabe muy bien—más que leer toda una colección del «Reader's Digest».

Nadie puede negar que el nombre de Waksman, como descubridor de la estreptomicina, es ya familiar a las gentes; en cambio, es la «élite» científica la que es capaz de valorar la obra básica de este hombre, que le ha permitido arribar a tal descubrimiento. Es de una trascendencia especial el momento en que, con su personalidad, el hombre de ciencia hace desviar los pasos de un camino trillado—de un sendero bien endurecido por tanta andadura soportada—e inicia otro nuevo. Otro, que sólo la visión del que tiene este sentido raro e intuitivo de la orientación, es capaz de abrir y de darle ánimos para hollar tierra nueva. Este momento es aquel en que Waksman, aún estudiante, ve claro que el suelo «no es una masa muerta de residuos inertes, sino una pléyade de seres vivos; en él se pueden reconocer filamentos de actinomicetos que rodean las partículas constituyentes de la tierra y que luego crecerán abundantemente formando del 10 al 50 por 100 de todas las colonias microbianas capaces de desarrollarse en las placas nutricias, sembradas con tierra». Por esto camina a marchas forzadas en el estudio de la Microbiología del suelo.

Si es cierto que la Microbiología hasta Pasteur estuvo en manos de biólogos y químicos, no lo es menos que desde Koch, pasa principalmente a las de los médicos. Aquella ciencia biológica pura por excelencia, se convierte de hecho en una ciencia aplicada a la Medicina. No es que tengamos que deplorar tal directriz, ya que a ello se debe especialmente el portentoso adelanto en la medicina preventiva de las enfermedades infecto-contagiosas; pero, mientras tanto, quedaba algo relegada la ciencia pura microbiana.

Justificada está, es cierto, tal tendencia, porque el hombre es el único ser que a través del tiempo y del espacio tiene un hambre insatisfecha que le obliga a vivir en una continua agonía. Para satisfacer esta su hambre y así integrarse, ha ido catando a diestro y siniestro los frutos en su circunstancia, y según le han valido para ésta su integración, los ha jerarquizado. La valorización suele estar en íntima relación con su carencia; de aquí que sea tan frecuente que mientras no se halle en falta de un «algo»—por alto valor real que tenga—, no conceda importancia a su posesión. De todas estas carencias,

la que más aprecia cuando no la posee es la salud. Ya Herófilo, médico y filósofo griego del 300 antes de Jesucristo, lo expresó con unas palabras admirables: «La ciencia y el arte no tienen nada que enseñar; el ánimo es incapaz de esfuerzo; la riqueza, inútil; y la elocuencia, ineficaz, si falta la salud».

Tan es así, que en uno de los Libros Sapienciales—el de Job, setecientos años antes de Jesucristo—se describe cómo un hombre va perdiendo sucesivamente todos sus bienes más preciados, y se hace indispensable una petición particular y explícita de Satán a Dios, para, en último término y como don más preciado, quitarle la salud. Dice así: «¡Piel por piel, cuanto el hombre tiene, lo daría gustoso por su vida. Pero, anda, extiende tu mano y tócale en su hueso y en su carne, a ver si no te vuelve la espalda». Yavé, dijo entonces a Satán: «Ahí lo tienes: en tu mano lo pongo, pero guarda su vida». O sea, que sólo le resta después de la salud la vida, como don más preciado.

Claro está, pues, que los descubrimientos que el hombre lleva a cabo en favor de la salud, son altamente estimados y conducen al corazón mismo de las gentes su gratitud para todo aquel que en este sentido es su bienhechor; y por encima de todos aquellos que puedan regalarle otros bienes. No es de extrañar, por tanto, que el principal papel y sus mayores éxitos los haya tenido la Microbiología en el campo de la Medicina. Mas, debido a esto, esta ciencia, en gran parte, se había limitado a una disciplina donde lo posible en nuestros tiempos estaba muy trillado.

Nuevos paisajes con agrestes montañas y profundos valles, bosques vírgenes y ríos salvajes, difíciles de vencer, esperaban ser estudiados. Waksman es como uno de aquellos de nuestros conquistadores, cuyos relatos de sus andanzas y gestas en tierras de América nos llenan de estupor y levantan en lo alto nuestra admiración. Es en estos campos vírgenes de la ciencia pura donde verdaderamente admira el experto en materia microbiológica al Profesor Waksman, y donde es desconocido por el no especializado.

El Profesor Waksman será recibido con aplausos salidos del corazón en todos los pueblos que en este viaje por las tierras de la vieja y eterna España va realizando. Estamos ciertos de que nuestro pueblo generoso no será remiso en sus aplausos y devoción, y de ello nos congratulamos sinceramente. Pero aquí, en el Paraninfo de esta Universidad Complutense, nuestra admiración y tributo, además de cordiales, es preciso que sean científicos. Y así admiramos su obra callada, aquella que se lee a través de sus 300 trabajos publicados y de sus ocho obras editadas. Al recibir el Profesor Waksman la investidura de Doctor por la Facultad de Ciencias, admiramos y rendimos homenaje al microbiólogo (o sea, al biólogo), al naturalista que superó sus tiempos cultivando campos de la ciencia pura que estaban yermos, y que si pudieron parecer a vistas miopes que no conducirían a nada, resultaron ser luego magníficos atajos.

La lección que hemos de aprender de este hombre a sus sesenta y dos años y en plena actividad, la encontramos particularmente en su criterio de que es

preciso hacer del campo de la Microbiología, por su contenido y complejidad, una ciencia independiente. Son tantas y tan variadas las aplicaciones de esta ciencia, que no puede quedar restringida a una asignatura de Medicina, Farmacia, Veterinaria o de Ciencias. Aquella Microbiología de unos pocos microbios patógenos ha sido superada; y son tantos sus aspectos, que por sí sola constituye toda una disciplina independiente, donde se estudia la vastedad de su ciencia pura del brazo de la Química Biológica y de la Químico-Física. No en vano decíamos al principio que esta fué la formación del Profesor Waksman como biólogo. Estableció una teoría de cimientos sólidos en la ciencia pura, que luego pudieron ser fecundos en rosetones, agujas y pináculos de ciencia microbiológica aplicada. El campo anchuroso de la Microbiología Industrial y en especial de las fermentaciones, sólo balbucea entre nosotros; y es que hacen falta—en frase del Profesor Waksman—muchos microbiólogos que se consideren, plena y exclusivamente, tales.

Por último, no podía faltar en nuestro sabio la bondad de un corazón enamorado de la ciencia, y, en consecuencia, de la verdad. Es exponente de este proceder el hecho de que el Profesor Waksman haya donado de un modo altruista los frutos de sus patentes de fabricación a la «Rutgers Research and Endowement Foundation».

Entre los múltiples honores que hay que destacar, con los que ha sido galardonado el Profesor Waksman por su labor científica y caritativa, figuran:

El premio John Scott, de la ciudad de Filadelfia.

El premio de Investigación 1949, de la «American Pharmaceutical Manufactures Association».

El premio de la Fundación Passano.

La medalla y premio «Emil Christian Hansen», de los Laboratorios Carlsberg, de Dinamarca.

La medalla de la «New Jersey Agricultural Society».

El premio Albert and Mary Lasker, de la «American Public Health Association».

El premio Amory, de la «American Academy of Arts and Sciences».

Es Socio y Socio de Honor de un gran número de Sociedades de su país y del extranjero, y en los Estados Unidos es miembro de la Academia Nacional de Ciencias.

Ha sido Presidente de la «Society of American Bacteriologists» y de la «American Chemical Society».

Es Miembro de Honor de gran número de Sociedades científicas extranjeras; en Méjico, Francia, Bélgica, Alemania, Suiza, India, etc.

Es Doctor H o n o r i s C a u s a, por Medicina, de la Universidad de Lieja, y por Ciencias, de las de Princetown y Rutgers, en Norteamérica.

A estos títulos va a añadir hoy, como hace unos días el de S o c i o d e H o n o r de la **Sociedad de Microbiólogos Españoles** y el de Miembro de Honor

del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, el título de Doctor H o n o r i s C a u s a , por Ciencias, en la multicentenaria Universidad Complutense, hermana señera de la inmortal de Salamanca, luminarias del saber de nuestro Siglo de Oro, que con sus disciplinas y enseñanzas esparcieron la semilla de nuestro intelecto en las tierras vírgenes y germinaron en los leves tallos del hoy ubérrimo árbol de la ciencia americana.

De júbilo es, por tanto, este día, en el que, al honrar al Profesor Waksman con tal investidura, nos honramos nosotros mismos al contar en nuestra hermandad, bajo la clámide acogedora del Alma Máter, con la figura del hombre bueno y sabio que es el Profesor Waksman, consagrado a la ciencia por bien de la humanidad.

Discurso del Profesor Waksman.

Estoy muy agradecido por el alto honor que me estáis confiriendo. Bien comprendo que, al honrarme, lo que hacéis es honrar a la ciencia, a la que he consagrado toda mi vida; es decir, a la Ciencia Microbiológica.

Desde la época de los primeros grandes maestros, especialmente Luis Pasteur y Roberto Koch, la Microbiología se ha desarrollado según dos distintas líneas directrices: por un lado, la Microbiología médica, y por otro, la Microbiología industrial y agrícola. Ambas ramas han aportado grandes contribuciones en el aspecto fundamental de esta ciencia, así como también en sus aplicaciones prácticas al mejoramiento de la vida del hombre. La primera se ha extendido y contribuído no solamente a nuestro conocimiento y a los métodos de control de las enfermedades humanas, sino también al de las enfermedades de las plantas y de los animales, y asimismo al mejoramiento y control de la salud pública.

La segunda ha contribuído al desarrollo de numerosas industrias de la fermentación, a la preparación y conservación de productos alimenticios y bebidas y a nuestros conocimientos de la microbiología del suelo y del estiércol, y otras muchas aplicaciones.

Durante algún tiempo parecía como si estas dos ramas de la joven ciencia de los microbios no llegarían a encontrarse. La nueva rama de los antibióticos ha servido para realizar la conexión. Los antibióticos son producto de la actividad de microorganismos saprofitos que habitan en su mayor parte en los suelos, en los montones de estiércol, en nuestros lagos y en nuestros ríos. Estos antibióticos han hallado amplia aplicación en el tratamiento de numerosas infecciones del hombre y de los animales. Han revolucionado la práctica médica.

Al dar realidad a los antibióticos, ambas ramas de la Microbiología han sido fusionadas otra vez. Con esta aportación de los antibióticos, la Microbiología ha prestado un destacado servicio al progreso de la humanidad, mejorando su posición económica, perfeccionando el tratamiento de las enfermedades y epidemias y haciendo que nuestro mundo reúna mejores y más seguras condiciones de vida.

Muchas gracias.

SIR HOWARD WALTER FLOREY

Graduado en Medicina y Cirugía, por Adelaida, tiene también el nuevo Miembro de Honor de la **Sociedad** el título de «Bachelor» en Ciencias, por Oxford, y es Doctor por Cambridge. Nombrado Profesor de Patología en la Universidad de Sheffield en 1931, pasó a ocupar el mismo puesto en la de Oxford en 1935, continuando actualmente en esta Cátedra. Fué elegido Miembro de la Real Sociedad de Londres, en 1941. Tiene el premio Camerón, por la Universidad de Edimburgo; la Medalla Lister, del Real Colegio de Cirujanos de Inglaterra; la Medalla de plata de Berzelius, de la Sociedad Sueca de Medicina; la Medalla de Oro Albert, de la Real Sociedad de Artes, y la de Oro de la Sociedad de Medicina. Es Comandante de la Legión de Honor y posee la Medalla al mérito, de los Estados Unidos. Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1945.

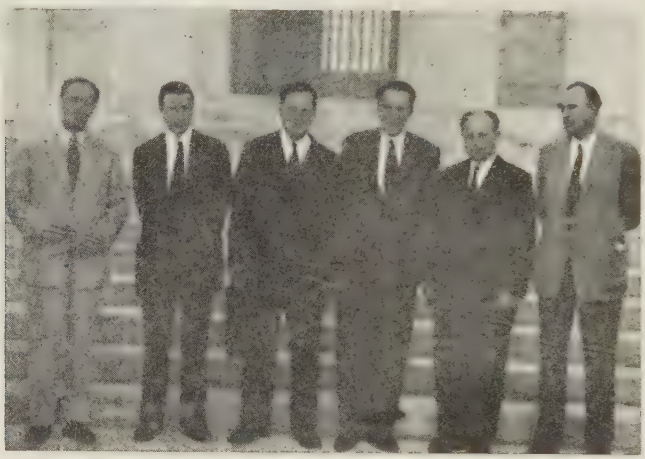
Sus principales investigaciones han versado sobre: procesos inflamatorios, con referencia especial a la producción de mucus; la circulación sanguínea capilar y las condiciones de los linfocitos; lisozima y antibióticos. Ha publicado un centenar de trabajos, de los que más de la mitad corresponden a antibióticos, y un buen números de estos últimos, a la penicilina. En español han aparecido dos trabajos suyos: «El uso de los microorganismos con fines terapéuticos» (**Revista de Sanidad e Higiene Pública**, Madrid, 1946), y «El empleo de la penicilina en la clínica» (**La Semana Médica,** Abril 1946).

EL PROFESOR PENSO, EN LA SOCIEDAD

Invitado por la **Sociedad de Microbiólogos,** ha permanecido durante el mes de junio unos días en España el Profesor Giuseppe Penso, del Instituto Superior de Sanidad, de Roma.

En la Sección local de Barcelona, donde estuvo primeramente, expuso los últimos avances sobre micobacterias, tema de su especialidad. En Madrid pronunció otra conferencia sobre tema análogo, bajo la presidencia del Profesor Clavero del Campo, dando a conocer en el mismo acto el Profesor Vilas, como Secretario de la **Sociedad,** la designación del Profesor Penso como Miembro de Honor de la misma, designación cordialmente agradecida por el interesado.

Las experiencias expuestas por el ilustre bacteriólogo italiano aparecerán próximamente en las páginas de **Microbiología Española.**



De izquierda a derecha, los Profesores Socías, Gastón de Iriarte. Penso, Clavero del Campo, Vilas y Bustinza, ante la entrada de la sede central del C. S. I. C.

NUEVA COLECCION DE BACTERIAS DE INTERES INDUSTRIAL

Para todos aquellos relacionados con la Microbiología Industrial, es importante saber que se ha iniciado recientemente en Inglaterra, en el «Chemical Research Laboratory» (Department of Scientific and Industrial Research), una colección nacional de bacterias no patógenas, que actualmente cuenta ya con más de trescientas estirpes.

El Laboratorio coleccionará todos los tipos de bacterias que se utilicen, hayan sido utilizadas o lo puedan ser en el futuro por la industria, concediendo especial interés a los organismos en período de experimentación. Asimismo, el Laboratorio, además de suministrar los cultivos propios, gestionará aquellos otros que no posea y le sean solicitados.

Los cultivos de la colección figurarán en la Lista de especies del Reino Unido, que se publicará el año 1951.

Para toda clase de informes, dirigirse al Director del «Chemical Research Laboratory, Teddington, Middlesex».

ACTAS DE LA SOCIEDAD

MADRID

ACTA DE LA SESION EXTRAORDINARIA CELEBRADA EL DIA 14 DE ABRIL DE 1950

En el salón de actos de la Sede Central del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117, y bajo la presidencia de don Juan Marcilla, se abre la sesión a las diecinueve treinta horas, con asistencia de Sir Howard Walter Florey, que se sienta a la derecha del Presidente.

Primeramente se da cuenta por la presidencia de que, con posterioridad a la reunión anterior de la Sociedad, la Junta Directiva tuvo noticia oficial de la venida a España, para asistir a los actos del X Pleno del Consejo, juntamente con otros científicos extranjeros, de Sir Howard Walter Florey y del Doctor S. A. Waksman, acordando, en consecuencia, proponer a la Sociedad el nombramiento de Miembros de Honor de los dos citados hombres de ciencia, acuerdo que premuras de tiempo impidieron llevar a cabo antes. Aprobada la propuesta por unanimidad, el señor Socías, seguidamente, da lectura a un trabajo suyo sobre «La etiología del tracoma», en el que expone los resultados obtenidos durante los diecisiete años en que ha venido trabajando sobre este tema.

Finalmente, don Juan Marcilla, tras unas palabras de elogio de Sir Howard Walter Florey, hace patente la satisfacción de la Sociedad por poder contar entre sus miembros al ilustre investigador británico, cerrando éste el acto con unas palabras, en español, de gratitud por la distinción recibida.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión.

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE ARTICULOS DE REVISTAS

Bajo este epígrafe se efectúa la publicación sistemática, por orden cronológico, de los títulos de los trabajos que han aparecido en los últimos años en las principales revistas microbiológicas. Ello permite una fácil orientación dentro del panorama internacional de la especialidad.

En este número se recogen los títulos de interés microbiológico correspondientes al **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad** (1926-1932) y su continuación, la actual **Revista de Sanidad e Higiene Pública** (1933-1949).

Mediante convenio con el Servicio de Microfilm del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la Sociedad puede facilitar a los señores socios reproducciones de los artículos que deseen, para lo cual bastará escribir al Secretario de la Sociedad, Serrano, 113, Madrid, precisando el número en negrita que encabeza el artículo cuya copia se solicita.

Los precios y condiciones se detallan al final de esta Sección.

1.412

BAILEY (Charles A.) y **ORTIZ DE LANDAZURI.**—1925. La anquilostomiasis en las minas de España. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 9-40. E. N. S.

1.413

SOUTO (José) y **BEATO (Federico).**—1926. La técnica de Mutermilch en el diagnóstico serológico de la sífilis. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 93-100. E. N. S.

1.414

SWELLLENGREBEL (N. N.).—1926. Informe sucinto del viaje efectuado en España por la Comisión del Paludismo de la Sociedad de las Naciones. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 131-144. E. N. S.

1.415

DURICH (J.).—1926. Estudio epidemiológico y clínico de un foco de disenteria sarampionosa en la provincia de Almería, determinado por el bacilo Shiga. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 163-190. E. N. S.

1.416

FUEJO GARCIA (D.).—1926. Un método oficial para practicar el análisis de las ostras. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 295-297. E. N. S.

1.417
TAPIA (Manuel) y TORRES (Juan).—1926. La velocidad de sedimentación de los eritrocitos en la fiebre tifoidea. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 343-376. E. N. S.

1.418
MORATO (Teófilo) y SASTRE (Fernando).—1926. Contribución al estudio de la reacción de Meinicke. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 437-444. E. N. S.

1.419
ABELLO PASCUAL (José).—1927. Nuevo método de investigación histopatológica en la tuberculosis pulmonar. Induración de esputos. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 5-18. E. N. S.

1.420
SOUTO BEAVIS (J.) y BEATO GONZALEZ (F.).—1927. Nuestra orientación en el estudio sanitario de los Parques o Viveros de moluscos. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 19-42. E. N. S.

1.421.
JIMENEZ (J.).—1927. Acción de las aguas de alcantarilla de Madrid sobre ciertos gérmenes patógenos intestinales. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 81-82. E. N. S.

1.422
SASTRE (Fernando).—1927. La determinación del pH en los medios de cultivo. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 83-102. E. N. S.

1.423
BUEN (Sadi de) y BUEN (Eliseo de).—1927. Primeros ensayos sobre el empleo del «Verde París» en España, en la lucha antipalúdica. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 161-168. E. N. S.

1.424
SOUTO BEAVIS (J.) y BEATO GONZALEZ (F.).—1927. El sero-diagnóstico de la sífilis. Contribución al estudio de la turbio-reacción de Dold. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 303-317. E. N. S.

1.425
GINER MATOSES (Clemente). —1927. La anquilostomiasis en Sueca. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 425-432. E. N. S.

1.426
PARTEARROYO (F. R.).—1927. Filtrabilidad del bacilo tuberculoso. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 489-494. E. N. S.

1.427
ROEHL (W.).—1927. Malarioterapia con plasmoquina en España. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 553-567. E. N. S.

1.428
BUEN (Sadi de).—1927. Nota acerca de la acción de la plasmoquina sobre las semilunas (Gametocitos de *Laverania malariae*). **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 767-770. E. N. S.

1.429
BELLOGIN y VICIANO.—1928. Lancha para la cianhidrización de buques. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 65-75. E. N. S

1.430
ALVAREZ CIENFUEGOS (J. Manuel).—1928. Algunos ensayos sobre nuevos tratamientos de paludismo. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 197-202. E. N. S.

1.431
GAILLAR.—1928. Notas sobre los Culex de Cáceres y Ciudad Real. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 324-332. E. N. S.

1.432
ANGUERA (A.).—1928. El diagnóstico serológico de la tuberculosis. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 359-363. E. N. S.

1.433
SOUTO BEAVIS (J.) y BEATO GONZALEZ (F.).—1928. Estudios sobre algunos aspectos en las mutaciones del bacilo coli. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 389-401. E. N. S.

1.434
BELLOGIN y VICIANO.—1928. Estudio comparativo entre el gas cianhídrico y la mezcla gaseosa de cloruro de cianógeno. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 453-463. E. N. S.

1.435
REDONDO FLORES (Antonio).—1928. La vacunación antitífica en el Ejército. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 517-539. E. N. S.

1.436
AZNAR (P.) y HOMBRIA (M.).—1928. Estudio de la flora bacteriana de las astas de toro y de las heridas que éstas ocasionan. **Boletín Técinico de la Dirección General de Sanidad.** 581-602. E. N. S.

1.437
AZNAR (P.) y HOMBRIA (M.).—1928. Estudio de la flora bacteriana de las astas de toro y de las heridas que éstas ocasionan. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 661-676. E. N. S.

1.438
BUEN (Sadi de).—1928. Importancia de la plasmoquina y del quinetum en la lucha antipalúdica. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 729-737. E. N. S.

1.439
CODINA SOUQUE (José).—1929. Cultivo del bacilo de Koch directamente del esputo. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 5-18. E. N. S.

1.440
ALVAREZ FERNANDEZ (A.).—1929. Nota breve sobre homogenización de esputos. Empleo del hipobromito sódico. **Baletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 73-78. E. N. S.

1.441
COLOMO DE LA VILLA (Santiago).—1929. Autovacuna al Yatren. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 149-155. E. N. S.

1.442

ABAL (Pedro).—1929. Estudios serológicos de la lepra. Reserva alcalina. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 201-206. E. N. S.

1.443

MILLARES (Antonio).—1929. Método rápido de fijación y coloración selectiva del aparato digestivo, tubos de Malpighio y ovarios en los Culícidos. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 555-556. E. N. S.

1.444

TAPIA (Manuel).—1929. La fiebre exantemática mediterránea o tifus benigno del verano. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 605-641. E. N. S.

1.445

DELOR (R.), PRIETO (C.) y MORATO (T.).—1930. Un caso de paludismo indígena en Asturias. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 27-31. E. N. S.

1.446

ALBALADEJO (Laureano).—1930. Estudio de la fiebre de Malta en la Malahá (Granada). **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 65-90. E. N. S.

1.447

CASTILLO (Heliodoro del).—1930. Algunas notas referentes a los antígenos gangrenosos y a la valoración de los sueros antigangrenosos. (Gangrena gaseosa). **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 114-117. E. N. S.

1.448

ALBALADEJO (Laureano).—1930. Estudio de la fiebre de Malta y fiebre tifoidea en Gabia Grande (Granada). **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 161-191. E. N. S.

1.449

MATILLA (V.) y Bermudo (L.).—1930. Consideraciones a un caso de alastrina. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 261-280. E. N. S.

1.450

ANGUERA (A.).—1930. Estudio clínico y experimental de la fiebre Sodoku (Spirochete morsus muris) en España. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 281-304. E. N. S.

1.451

SANCHIS BAYARRI (V.) y MONTOLIU VOLANT (C.).—1930. Un caso de encefalitis postvacunal. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 356-364. E. N. S.

1.452

SOUTO BEAVIS y BEATO GONZALEZ.—1930. La prueba de Pinzani, como método de orientación en el estudio sanitario de las aguas de alimentación. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 675-688. E. N. S.

1.453

ANGUERA (A.).—1931. Contribución al diagnóstico serológico del cáncer. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 1-10. E. N. S.

1.454

MARIN DE BERNARDO (J.).—1931. Las pulgas pestígenas del puerto de Algeciras. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 65-72. E. N. S.

1.455
BUEN (Eliseo de) y CAMARA (Pedro de la).—1931. Notas sobre 59 casos de fiebre recurrente española. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 193-207. E. N. S.

1.456
BEATO (Federico).—1931. El problema de la herencia en las bacterias. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 329-359. E. N. S.

1.457
ZARCO (Pedro) y JIMENEZ (Jesús).—1931. Nota sobre una técnica segura para el cultivo del ultra-virus tuberculoso. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 449-454. E. N. S.

1.458
PORTA (Ezequiel).—1931. Contribución al estudio de la fiebre de Malta en la Isla de Menorca. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 457-480. E. N. S.

1.459
CUMMING (H. S.).—1931. Relaciones entre los vibriones no aglutinables y los vibriones coléricos **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 481-483. E. N. S.

1.460
MONTAÑES.—1931. Chancro blando. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 513-529. E. N. S.

1.461
BLANCO (Francisco).—1931. Sobre la numeración del bacilo tuberculoso en los cultivos. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 641-651. E. N. S.

1.462
SOUTO BEAVIS (José) y BEATO (Federico).—1931. Contribución al estudio del empleo del fenol-alcohol como antígeno en la reacción de Wassermann. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 705-731. E. N. S.

1.463
LUENGO (Nicasio).—1931. Sobre algunas constantes físicas de los sueros terapéuticos. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 733-743. E. N. S.

1.464
MONTAÑES (Pablo).—1932. La reacción de Rubino en la lepra. Su valor diagnóstico. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 3-25. E. N. S.

1.465
SAN MIGUEL TARAZONA (Antonio). — 1932. Bacteriología de las piorreas alveolo-dentarias. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 26-51. E. N. S.

1.466
MARTIN YUMAR (Domingo).—1932. La contaminación y autodepuración de las aguas del río Ebro (zona Tudela-Alcalá de Ebro) y del canal de Tauste. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 185-218. E. N. S.

1.467
SANZ IBAÑEZ (J.).—1932. Contribución al estudio del cultivo del virus vacunal «in vitro». **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 265-277. E. N. S.

1.468
IBAÑEZ GONZALEZ (Rafael).—1932. Contribución al estudio del fenómeno de Shwartzman. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 345-372. E. N. S.

1.469
MUÑOZ SECA (J.), SANCHEZ DE LINARES (P.) e ITURRIAGA (E. de).—1932. Resultados de la revisión de 549 niños vacunados con la B. C. G. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 473-476. E. N. S.

1.470
SAENZ (A.).—1932. Los progresos recientes de nuestros conocimientos sobre la vacuna preventiva de la tuberculosis por el «B. C. G.» **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 537-553. E. N. S.

1.471
ARROYO (Crescenciano), GARCIA (Isidoro) e HIDALGO (Julio).—1932. La higiene de la leche en Madrid. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 641-677. E. N. S.

1.472
BAQUERO GIL (Gregorio).—1932. Técnica de investigación del índice de viabilidad de los bacilos tuberculosos en el esputo. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 693-705. E. N. S.

1.473
ROMAN MANZANETE (José).—1932 Propuesta de un método patrón para el análisis bacteriológico de aguas potables. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 745-778. E. N. S.

1.474
ALMARZA (N.).—1932. El «VIEV». (Instituto de Veterinaria Experimental de toda la Unión de Repúblicas Soviéticas Rusas). **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 849-857. E. N. S.

1.475
HARGUINDEY HARGUINDEY (Tomás).—1932. La profilaxis diftérica. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 913-953. E. N. S.

1.476
CERDA RAYA (Arturo).—1932. Análisis sanitario de aguas y Plankton. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 954-989. E. N. S.

1.477
BUEN (Sadi de).—1932. La espiroquetosis española. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 1.033-1.052. E. N. S.

1.478
CERDA RAYA (Arturo).—1932. Análisis sanitario de aguas y Plankton. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 1.084-1.098. E. N. S.

1.479
LIRIA BORDERAS (A.) y FERNANDEZ M. TUREGANO (J.).—1932. Aportaciones al problema de la inmunidad en la malaria experimental. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 1.171-1.196. E. N. S.

1.480
CERDA RAYA (Arturo).—1932. Análisis sanitario de aguas y Plankton. **Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad.** 1.213-1.239. E. N. S.

1.481
MAS Y MAGRO (F.).—1933. La morfología y la génesis de las inclusiones intracelulares de V. Prowazek y Halberstadter en el tracoma. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 1-8. E. N. S.

1.482
FERNANDEZ MARTINEZ TUREGANO (José).—1933. Valor de la reacción de Vernes con el «peretinol» en la sífilis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 9-22. E. N. S.

1.483
ESPINOS GISBERT.—1933. Consideraciones sobre la nueva orientación en la etiología de la tuberculosis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 49-58. E. N. S.

1.484
SAYE (Luis).—1933. Resultados obtenidos con la vacuna antituberculosa B. C. G. de Calmette-Guerin (1924-1931). **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 113-132. E. N. S.

1.485
SAINZ DE LOS TERREROS (C.).—1933. La dermo-reacción de Loewenstein en la práctica médico-escolar. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 133-143. E. N. S.

1.486
FERNANDEZ MARTINEZ TUREGANO (José).—1933. Valor de la reacción de Vernes con el «peretinol» en la sífilis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 144-166. E. N. S.

1.487
FANJUL (Luis).—1933. Aportación al estudio de la bacilemia tuberculosa experimental. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 230-241. E. N. S.

1.488
SOUTO BEAVIS (José) y BEATO (Federico).—1933. Valoración de las pruebas para diferenciar el coli fecal del coli aerógenes. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 441-472. E N. S.

1.489
HERVAS MONCHO (María).—1933. Contribución al estudio de la inmunidad local. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 588-630. E. N. S.

1.490
HERVAS MONCHO (María).—1933. Contribución al estudio de la inmunidad local. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 23-51. E. N. S.

1.491
ANDUEZA (Pedro H.).—1933. La estación depuradora de aguas residuales por fangos activados de Pontevedra. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 52-64. E. N. S.

1.492
MATILLA (V.).—1933. A propósito de algunos casos de rabia humana. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 166-175. E. N. S.

1.493
GALLARDO (Eduardo).—1933. Vacunación subcutánea con neurovacuna. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 176-181. E. N. S.

1.494
DIAZ FLOREZ (A.), CASAS (U.), GARCIA DE COSA (C.) y ORTEGA (David).—1933. Ensayos sobre la acción inmediata del nuevo preparado «Atebrín Bayer» contra el paludismo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 182-185. E. N. S.

1.495
MIÑON CALVO (Manuel.—1933. Contribución al estudio de la reacción Sachs-Witebsky al citocol (citochol-reaktion II). **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 245-248. E. N. S.

1.496
PRAUSNITZ (Carl).—1933. Teorías y aplicaciones prácticas del bacteriófago. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 321-338. E. N. S.

1.497
BLANCO (Julio) y CODINA SUQUE (José).—1933. La acción bactericida de los rayos solares sobre los esputos tuberculosos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 378-390. E. N. S.

1.498
SALVAT NAVARRO (Antonio).—1933. Nota previa acerca de las formas ultramicoscópicas de los estreptococos patógenos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 433-437. E. N. S.

1.499
APRAIZ Y BUESA (Luis de).—1933. La vida del B. C. G. en los medios conservadores. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 490-492. E. N. S.

1.500
ZAPATERO BALLESTEROS (E.) y MARTINEZ BRUNA (Julio).—1933. La higienización de la leche por el método de Stassano. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 552-572. E. N. S.

1.501
HARGUINDEY (Tomás).—1934. Formas malignas de difteria. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 1-10. E. N. S.

1.502
GIL COLLADO (J.) y CARTAÑA CASTELLA (P.).—1934. Un caso interesante de emigración orientada del A. maculipennis durante la época invernal. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 29-33. E. N. S.

1.503
VAAMONDE FERNANDEZ (J.).—1934. Contribución al estudio de la lepra en Galicia. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 97-107. E. N. S

1.504
CARTAÑA (P.) y BALEN (J.).—1934. Sobre un estudio de las ratas de Barcelona y sus ectoparásitos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 193-209. E. N. S.

1.505
GARMENDIA LANDA (Tomás), MANZANETE (José Román) y PRADA Y FERNANDEZ MESONES (Joaquín de).—1934. Bases para la estimación y calificación del agua potable. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 410-422. E. N. S.

1.506
PRIOR (Andrés L.) y URIARTE (Ramón).—1934. Un caso confirmado de espiroquetosis icterohemorrágica en San Sebastián. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 529-541. E. N. S.

1.507
URGOTI (Alvaro) y BEATO (Federico).—1934. El antígeno de Witebsky, Klingenstein y Kuhn en el diagnóstico serológico de la tuberculosis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 1-19. E. N. S.

1.508
ZAPATERO (Emilio).—1934. El fenómeno de la variación bacteriana en el bacilo tífico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 20-55. E. N. S.

1.509
BEATO (Federico).—1934. Cuestiones bacteriológicas de actualidad. El problema del núcleo en las bacterias. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 209-263. E. N. S.

1.510
GOMEZ J. DE CISNEROS (J. M.).—1934. Las técnicas de Fortner para el cultivo de anaerobios y observación microscópica del crecimiento bacteriano. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 326-349. E. N. S.

1.511
GRACIAN CASADO (M.).—1934. Importancia de la reacción de Schick en la profilaxis de la difteria y simplificaciones en la técnica de la misma. **Revista de Sanida e Higiene Pública.** II: 350-352. E. N. S.

1.512
PERALTA ALFEREZ (Eugenio).—1934. Valor práctico de los medios de cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 445-459. E. N. S.

1.513
ZAPATERO (Emilio).—1935. El fenómeno de la variación bacteriana en el bacilo tífico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 1-11. E. N. S.

1.514
VILLANUEVA CASTRO (Ulpiano).—1935. Bacterium typhi flavum. Investigaciones a propósito de la presencia de este germen amarillo en la naturaleza y estudio de 76 razas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 12-32. E. N. S.

1.515

SANCHIS BAYARRI (V.), MONTOLIU VOLANT (C.) y SABINA PARRA (F.).—1935. Contribución al estudio de la espiroquetosis icterohemorrágica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 113-124. E. N. S.

1.516

VILLANUEVA CASTRO (Ulpiano).—1935. Bacterium typhi flavum. Investigaciones a propósito de la presencia de este germen amarillo en la naturaleza y estudio de 76 razas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 125-152. E. N. S.

1.517

CALLAO (V.).—1935. La vitrificación de la cápsula, reacción diferencial de los tipos afines del neumococo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 225-231.

1.518

SOUTO BEAVIS (José) y BEATO GONZALEZ (Federico).—1935. Los métodos de conservación, selección y enriquecimiento, en las heces de portadores de los bacilos del grupo tífico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 433-469. E. N. S.

1.519

ANDOLIZ AGUILAR (Francisco).—1935. Antitoxina diftérica circulante y vacunación. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 529-559. E. N. S.

1.520

SOCIAS (A.) y DELGADO (J.).—1935. Aportaciones a la epidemiología del tracoma. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 560-570. E. N. S.

1.521

BUEN (Sadi de).—1935. Algunas observaciones sobre el comportamiento del Treponema hispanicum en el Ornithodorus erraticus. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 97-120. E. N. S.

1.522

ZARCO (P.) y DOMINGUEZ (J.).—1935. Resultados del método de Löwenstein en la investigación de la bacilemia tuberculosa. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 121-139. E. N. S.

1.523

BUEN (Sadi de).—1935. Algunas observaciones sobre el comportamiento del Treponema hispanicum en el Ornithodorus erraticus. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 193-212. E. N. S.

1.524

NAJERA ANGULO (Luis).—1935. La dermorreacción de Loewenstein a la tuberculina y la prueba de Pirquet, en la práctica médico-escolar. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 327-334. E. N. S.

1.525

ALBALADEJO (L.).—1935. Etiología, sintomatología y epidemiología de la fiebre acuática. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 335-345. E. N. S.

1.526

GOMEZ J. DE CISNEROS (J. M.) y CABRERO GOMEZ (F.).—1935. Formas de variación por la lactosa del bacterium coli. Concepto actual del bacterium coli mutabili. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 402-415. E. N. S.

1.527

SOUTO BEAVIS (José) y BEATO GONZALEZ (Federico).—1935. El control sanitario de los parques o criaderos de moluscos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 481-510. E. N. S.

1.528

ESPINOSA INFANZON (José).—1935. Investigación del bacilo de Koch en la leche de nodrizas tuberculosas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 511-525. E. N. S.

1.529

ESPINOSA INFANZON (José).—1936. Investigación del bacilo de Koch en la leche de nodrizas tuberculosas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 35-41. E. N. S.

1.530

SOCIAS (A.).—1936. Sobre el agente etiológico del tracoma. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 106-123. E. N. S.

1.531

BEATO (Federico) y MACHO (Alfredo).—1936. La segunda reacción rábica de Cantani en el diagnóstico serológico de la sífilis (R. R. C. II.) **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 193-204. E. N. S.

1.532

MARCO y AHUIR (Lorenzo-Roberto).—1936. Contribución al estudio de la depuración de las aguas sucias por los «barros activos». **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 294-324. E. N. S.

1.533

HERRAIZ BALLESTEROS (Leopoldo).—1936. Consideraciones sobre la carga eléctrica de los gérmenes y su determinación. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 329-335. E. N. S.

1.534

HERRAIZ BALLESTEROS (Leopoldo).—1936. El mecanismo de la Gram positividad y su equivalente físico-químico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 407-415. E. N. S.

1.535

SOCIAS (A.) y POVEDA (E.).—1936. De los factores endémicos del tracoma. Su estudio en el término municipal de Murcia. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 497-524. E. N. S.

1.536

PEREZ PARDO (Justiniano).—1936. Leches tuberculosas de consumo en Madrid. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 1-12. E. N. S.

1.537

BUEN (Sadi de).—1936. Observaciones sobre el comportamiento del *Treponema hispanicum* en el *Ornithodorus erraticus*. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 13-18. E. N. S.

1.538

PEREGALLO (Italo).—1936. Investigaciones experimentales acerca de las bujías para filtración amicrobiana. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 104-111. E. N. S.

1.539
ROMAN MANZANETE (J.).—1936. Fénomeno de borde, Disociación del bacilo tífico biotipo Alfa. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 165-169. E. N. S.

1.540
EZIO PERINI (Pietro).—1936. Observaciones acerca del empleo de las bujías filtrantes. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 170-172. E. N. S.

1.541
GOMEZ J. DE CISNEROS (J. M.).—1936 Nuestros conocimientos actuales sobre los agentes productores y formas endémica y epidémica de las dermatomicosis en España. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 245-262. E. N. S.

1.542
PEREZ PARDO (Justiniano).—1936. Densidad del bacilo de Koch. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 233-244. E. N. S.

1.543
GOMEZ J. DE CISNEROS (J. M.) y CAÑIZARES (Orlando).—1936. Estudio de los Trichophyton del grupo Gypseum aislados en España. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 245-262. E. N. S.

1.544
GIMENO ONDOVILLA (Antonio).—1937. Complejo simbiótico (organismo Koch). **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 1-18. E. N. S.

1.545
ROMAN MANZANETE (J.).—1937. Una nueva concepción de la estructura biológica del bacilo tífico. Los bictipos Alfa y Beta. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 65-114. E. N. S.

1.546
ROMAN MANZANETE (J).—1937. La mutación biológica del bacilo tífico. Génesis del biotipo Beta. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 137-162. E. N. S.

1.547
ROMAN MANZANETE (J).—1937. La virulencia del bacilo tífico. (Primera parte.) Evolución del antígeno Vi. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 205-228. E. N. S.

1.548
FORNIELES ULIBARRI (Francisco) y CALLAO FABREGAT (Vicente).—1937. Estudio de portadores de gérmenes de faringe y nasofaringe. (Segunda parte.) **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 271-296. E. N. S.

1.549
SERRANO SALAGARAY (Angel).—1937. El proceso íntimo de la inmunización activa. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 477-479. E. N. S.

1.550
BURNET (Etienne).—1937. Las rickettsiosis humanas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IX: 631-643. E. N. S.

1.551
BRAVO SAN FELIU (Julio), LA ROSA KING (Guillermo de) y HOMBRIA IÑIGUEZ (Manuel).—1937. Unificación y metodización de las investigaciones serológicas de la sífilis en los servicios antivenéreos del Estado. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IX, X, XI y XII: 123-135. E. N. S.

1.552
GARRIDO QUINTANA (F.) y SUAREZ PEREGRIN (E.).—1938. Simplificación en la serología de la sífilis. La S. W. II y la M. K. R. II como únicas reacciones. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 194-199. E. N. S.

1.553
FERNANDEZ (Obdulio).—1938. La inmunidad en su aspecto químico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 289-293. E. N. S.

1.554
NAJERA ANGULO (Luis).—1938. Un tubo especial para la captura de Phlebotomus. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 294-297. E. N. S.

1.555
VICH (A.) y REY (F.).—1938. Recientes adquisiciones en paludismo. Contribución al conocimiento de la fase tisular del ciclo asexuado de la histiocitomatosis palúdica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 317-331. E. N. S.

1.556
GARRIDO QUINTANA (F.) y SUAREZ PEREGRIN (E.).—1939. Simplificación en la serología de la sífilis. La S. W. II y la M. K. R. II como únicas reacciones. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI: 689-695. E. N. S.

1.557
SOUTO (José) y BEATO (Federico).—1939. Estudio bacteriológico e Investigación de salmonelas en mariscos intensamente contaminados. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 755-793. E. N. S.

1.558
DIEZ MELCHOR (Francisco).—1939. Estudio de la reacción de Weltmann. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 822-828. E. N. S.

1.559
ARBELO CURBELO (Antonio).—1940. La reacción de Schick en los indígenas de los territorios españoles del Golfo de Guinea. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 189-193. E. N. S.

1.560
ZAPATERO (Emilio).—1940. Un medio de cultivo, sin carne ni peptona, para uso corriente en Bacteriología. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 202-205. E. N. S.

1.561
NAJERA ANGULO (Luis).—1940. La distribución geográfica de los Phlebotomus en España y datos relativos a más de cincuenta localidades nuevas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 290-304. E. N. S.

1.562
FERNANDEZ (Obdulio).—1941. La inmunidad en su aspecto químico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 8-11. E. N. S.

1.563
DURICH (J.).—1941. La fiebre exantemática mediterránea en Baleares. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 34-43. E. N. S.

1.564
GONZALEZ RODRIGUEZ (Pedro).—1941. Acido ascorbico e intoxicación diftérica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 97-120. E. N. S.

1.565
PEREZ GALLARDO (F.).—1941. La infección rábica por vía intraperitoneal y el bloqueo del sistema reticuloendotelial. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 121-133. E. N. S.

1.566
FIGUERIDO (César).—1941. Aspectos de higiene psíquica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 134-140. E. N. S.

1.567
MAS RAMOS (A.) y GARCIA PALACIOS (F.). —1941. Bosquejo demográfico-epidemiológico sobre tuberculosis en Ceuta. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 141-145. E. N. S.

1.568
GRACIAN (Miguel).—1941. Ensayos de vacunación antipestosa en el ratón. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 240-243. E. N. S.

1.569
BEATO (Federico).—1941. Las nuevas orientaciones en el diagnóstico bacteriológico de la difteria. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 417-472. E. N. S.

1.570
SOCIAS (A.).—1941. De la presencia intranuclear de las inclusiones (Corpúsculos de Rá) en el tracoma. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 473-489. E. N. S.

1.571
LOZANO MORALES (Alvaro).—1941. Contribución al diagnóstico exacto del paludismo por Pl. Falciparum. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 511-512. E. N. S.

1.572
TELLO-VALDIVIESO (F.).—1941. Resultado de la tipificación de neumococos con suero I y II en procesos respiratorios. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 576-581. E. N. S.

1.573
GRACIAN (Miguel).—1942. Las estufas de cultivo para bacteriología. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 24-32. E. N. S.

1.574
VAAMONDE FERNANDEZ (J.) y SAIZ MORENO (L.).—1942. La aglutinación en la práctica diagnóstica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 73-78. E. N. S.

1.575
SAIZ MORENO (J.).—1942. Nuevas aportaciones sobre el virus rábico y la vacuna Semple. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 133-140. E. N. S.

1.576
SUAREZ DE PUGA (L.).—1942. Contribución al estudio sobre el diagnóstico serológico de las brucelosis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 154-158. E. N. S.

1.577
VALLEJO DE SIMON (Antonio María).—1942. Tifus exantemático murino e histórico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 175-207. E. N. S.

1.578

CALLAO (V.) y URIOSTE (R. de).—1942. Variación de la raza de bacilo diftérico Park núm. 8, conservada en medio anoxibiótico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 240-245. E. N. S.

1.579

GRACIAN (Miguel).—1942. El caldo de cultivo «3B» para producción de toxina diftérica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 251-252. E. N. S.

1.580

FERNANDEZ (Obdulio).—1942. La inmunidad en su aspecto químico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 269-275. E. N. S.

1.581

GIROUD (Paul) y PANTHIER (René).—1942. Adaptación al pulmón del conejo de rickettsias de tifus histórico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 352-361. E. N. S.

1.582

SUAREZ (Eduardo) y COVALEDA (Justo).—1942. Contribución al diagnóstico de laboratorio del tifus exantemático. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 446-454. E. N. S.

1.583

IBAÑEZ GONZALEZ (Rafael).—1942. Notas sobre quimio-inmunidad y sobre paso transplacentario del tripanosoma equiperdum. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 542-548. E. N. S.

1.584

PEREZ GALLARDO (F.).—1942. El bloqueo del sistema reticuloendotelial y la infección por el virus del tifus exantemático. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 572-576. E. N. S.

1.585

URIOSTE (R. de).—1943 Flora y acidez en algunas vaginas sin bacilos de Doderlein. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 100-101. E. N. S.

1.586

URIOSTE (R. de).—1943. Método de tinción del bacilo de Koch visible para los daltonianos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 102-102. E. N. S.

1.587

CLEMENTE (Pedro).—1943. Tratamiento antirrábico. Método de Högyes. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 311-328. E. N. S.

1.588

GIMENO ONDOVILLA (Antonio).—1943. Un caso de seudotuberculosis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 425-428. E. N. S.

1.589

CALLAO (V.).—1943. El diagnóstico del tipo del neumococo (prueba de Neufeld en el esputo desecado). **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 442-447. E. N. S.

1.590

PEÑA YAÑEZ (Julián).—1944. Estudios sobre la disenteria bacilar. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 46-51. E. N. S.

1.591
CALLAO FABREGAT (Vicente).—1944. Influencia del medio de cultivo y del germen en la formación de la toxina diftérica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 95-130. E. N. S.

1.592
REMLINGER (P.).—1944. Los microbios ablastocynethes. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 131-133. E. N. S.

1.593
CABRERO GOMEZ (Francisco).—1944. Utilización en Bacteriología del agar-agar español **Revista de Sanidad e Hiene Pública.** II: 134-146. E. N. S.

1.594
PEÑA YAÑEZ (Julián).—1944. Estudios sobre la disenteria bacilar. Contribución al diagnóstico bacteriológico del grupo disentérico Flexner. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 173-195. E. N. S.

1.595
CAMARA (Pedro de la).—1944. Un método perfeccionado para la coloración de gotas gruesas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 196-206. E. N. S.

1.596
GALLARDO (E.), SANZ (J.) y PEREZ GALLARDO (F.).—1944. Datos experimentales sobre el cultivo de la Rickettsia Prowazeki en la membrana vitelina del embrión de pollo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 269-273. E. N. S.

1.597
REMLINGER (P.).—1944. El fenómeno de Anteo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 351-354. E. N. S.

1.598
LOZANO MORALES (Alvaro).—1944. La disección del intestino medio y posterior y del aparato sexual en las hembras de anofelinos, en relación con el índice ooquístique. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 380-382. E. N. S.

1.599
CALLAO FABREGAT (V.).—1944. El factor «caballo» en la elaboración del suero antidiftérico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 407-423. E. N. S.

1.600
CAQUERO GIL (G.).—1944. Visión crítica doctrinal de las nuevas aportaciones a la patogenia y diagnóstico parasitológico del paludismo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 440-446. E. N. S.

1.601
REMLINGER (P.).—1945. Contribución al estudio de la acción de las sustancias coloreadas sobre los microorganismos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 3-9. E. N. S.

1.602
REY VILLA (Fernando).—1945. Estudios sobre algunos protozoos en especial de los del género Plasmodium, en el hospedador vertebrado. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 81-101. E. N. S.

1.603
REY VILLA (Fernando).—1945. Estudios sobre algunos protozoos parásitos, en especial los del género Plasmodium, en el hospedador vertebrado. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 145-159. E. N. S.

1.604
CALLAO (V.).—1945. El concepto actual de anaerobiosis como base para la simplificación de los métodos de cultivo anaerobios. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 160-166. E. N. S.

1.605
GARCIA LOPEZ (Pedro).—1945. Los estreptococos anaerobios en la infección puerperal. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 182-188. E. N. S.

1.606
GALLARDO (Eduardo).—1945. Vacuna y vacunación antivariólica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 209-218. E. N. S.

1.607
IBAÑEZ GONZALEZ (Rafael).—1945. Progresos en vacunoterapia. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 219-236. E. N. S.

1 608
CLAVERO (G.) y ROMEO VIAMONTE (J. María). — 1945. Nota sobre el Anopheles (Myzomya) hispaniola Theo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 289-291. E. N. S.

1.609
IBAÑEZ GONZALEZ (Rafael).—1945. Actividad antibiótica de razas de mohos aislados del ambiente del laboratorio. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 292-302. E. N. S.

1.610
REMLINGER (P.).—1945. Cromovacunación de la gallina contra el cólera. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 369-369. E. N. S.

1.611
CLAVERO (G.).—1945. Cuatro especies de Aedes nuevas para España. (Dip. Cul.). **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 449-453. E. N. S.

1.612
ELVIRA GOICOECHEA (José).—1945. Contribución al estudio del proceso de autodepuración de las aguas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 463-477. E. N. S.

1.613
BARBOSA (A.).—1945. La inmunidad en el paludismo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 478-502. E. N. S.

1.614
ELVIRA GOICOECHEA (José).—1945. Contribución al estudio del proceso de autodepuración de las aguas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VIII: 536-569. E. N. S.

1.615
REMLINGER (P.).—1945. Los fracasos del tratamiento antirrábico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IX: 589-597. E. N. S.

1.616
ELVIRA GOICOECHEA (José).—1945. Contribución al estudio del proceso de autodepuración de las aguas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IX: 598-632. E. N. S.

1.617
ROMEO VIAMONTE (José María) e IRIGOYEN RAMIREZ (Antonio).—1945. Nota previa sobre el anofelismo de la Zona del Protectorado español de Marruecos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** X: 669-674. E. N. S.

1.618.
LOZANO MORALES (Alvaro).—1945. Nuevo método de disección de las glándulas salivares en relación con el índice esporozoitico. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** X: 675-677. E. N S.

1.619
IBAÑEZ GONZALEZ (Rafael).—1945. Relación entre virulencia, actividad antigénica y aglutinabilidad en el género Brucella. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI: 749-753. E. N. S.

1.620
IBAÑEZ GONZALEZ (Rafael) y MARTINEZ MATA (Justo). -1945. Relación entre virulencia, actividad antigénica y aglutinabilidad en el género Brucella. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI: 754-767. E. N. S.

1.621
REMLINGER (P.).—1945. Cromovacunación del mal rojo del puerco. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 852-854. E. N. S.

1.622
PEREZ PARDO (J.).—1945. Virus rábico y sustancias rabicidas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 855-886. E. N. S.

1.623
BERMUDEZ PAREJA (M.) y MARIN BUENO (E.).—1946. Transmisión del parasitismo por Plasmodium gallinaceum. **Revista de Sanidad e Higiene Pública** I: 5-21. E. N. S.

1.624
SANZ IBAÑEZ (J.).—1946. Estudio experimental de la poliomielitis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 215-220. E. N. S

1.625
RAMON (G.).—1946. La sueroterapia de la difteria. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 221-238. E. N. S.

1.626
LOZANO MORALES (Alvaro).—1946. Contribución al estudio de la biología del A. maculipennis Var. atroparvus en función del ambiente. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 239-250. E. N. S.

1.627
SAINZ MORENO (Laureano).—1946. Estado actual del problema de la profilaxis antirrábica en España y medios eficaces de lucha contra esta enfermedad. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 258-282. E. N. S.

1.628
FLOREY (Howard W.).—1946. El uso de los microorganismos con fines terapéuticos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 549-574. E. N. S.

1.629
DURICH (Juan).—1946. Contribución al estudio de la poliomielitis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 663-700. E. N. S.

1.630
RAMON (G.).—1946. Las Anatoxinas: Resultados de veinte años de aplicación en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 701-718. E. N. S.

1.631
RUIZ MERINO (José).—1946. A propósito de 105 casos de tiña tricofítica por el Tr. violaceum. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VII: 719-728. E. N. S.

1.632
CLAVERO (G.) y ROMEO VIAMONTE (J. M.).—1946. Hallazgo del Anopheles (Myzomya) multicolor Camboulio en España. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** X: 1.001-1.011. E. N. S.

1.633
RUIZ MERINO (José).—1946. Procedimiento de tinción de cápsulas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI: 1.112-1.113. E. N. S.

1.634
CLAVERO (G.).—1946. Aedinos de España. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 1.207-1.232. E. N. S.

1.635
CALLAO (V.).—1947. El problema de los tipos del neumococo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 95-118. E. N. S.

1.636
REMLINGER (P.) y BAILLY (J.).—1947. La sustitución del conejo por el perro para las vacunaciones antirrábicas. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 197-198. E. N. S.

1.637
GIL COLLADO (J.).—1947. Hallazgo en España del Ornithodorus coniceps Can. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 229-232. E. N. S.

1.638
RICO-AVELLO y RICO (C.).—1947. Aportación española a la historia del paludismo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 483-525. E. N. S.

1 639
GALLARDO (Eduardo).—1947. Concepto, caracteres generales e identificación de los virus. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 593. E. N. S.

1.640
RICO-AVELLO y RICO (C.).—1947. Aportación española a la historia del paludismo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 594-626. E. N. S.

1.641
MARTIN DEL PRADO (Mauro).—1947. Nota sobre la vacunación antirrábica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VIII: 798-804. E. N. S.

1.642
BERMUDEZ PAREJA (Manuel).—1947. Fases parasitológicas de las plasmodiosis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VIII: 805-824. E. N. S.

1.643
LOPEZ JAMAR (Enrique).—1947. Algunas modificaciones ventajosas en la reacción de Wassermann con suero activo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI: 1.125-1.138. E. N. S.

1.644
DURICH (Juan).—1947. Las infecciones por bacilos disentéricos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 1.167-1.190. E. N. S.

1.645
RICO-AVELLO (C.).—1947. Los análisis microscópicos de sangre en la investigación de los parásitos hemáticos y en el diagnóstico de las anemias **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XII: 1.191-1.214. E. N. S.

1.646
DURICH (Juan).—1948. Las infecciones por bacilos disentéricos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 5-33. E. N. S.

1.647
MALDONADO (Mariano).—1948. El diagnóstico por aglutinación en gota gruesa. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 130-136. E. N. S

1.648
VEERARAGHAVAN (N.).—1948. Estudios sobre la inmunización antirrábica con vacuna cultivo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 144-155. E. N. S.

1.649
COX (Herald R.).—1948. Psitacosis, ornitosis y virus afines. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** III: 229-253. E. N. S.

1.650
GRACIAN (M.).—1948. La inmunidad sin anticuerpos en la infección por el bacilo de Koch. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 298-318. E. N. S.

1.651
SUAREZ PEREGRIN (Eduardo).—1948. Una nueva técnica de preparación de vacuna anticolérica. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 319-323. E. N. S.

1.652
GIL COLLADO (J.).—1948. Acaros Ixodoideos de España. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 389-440. E. N. S.

1.653
IBAÑEZ (Rafael).—1948. Nota sobre la acción de la estafilotoxina sobre hematíes humanos de los diversos grupos sanguíneos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 441-444. E. N. S.

1.654
VILLAR SALINAS (Jesús).—1948. La vacunación antituberculosa con B. C. G. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 487-522. E. N. S.

1.655
PEREZ PARDO (Justiniano).—1948. Informe sobre el I Congreso Internacional del B. C. G. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI-XII: 965-984. E. N. S.

1.656
BEATO GONZALEZ (Federico).—1949. El complejo antigénico del colibacilo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** I: 26-60. E. N. S.

1.657
BEATO GONZALEZ (Federico).—1949. El complejo antigénico del colibacilo. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** II: 101-128. E. N. S.

1.658
PEREZ GALLARDO (F.) y FOX (John P.).—1949. Infección e inmunización de los animales de laboratorio con Rickettsia prowazeki de patogenidad reducida, cepa E. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** IV: 291-315. E. N. S.

1.659
IBAÑEZ (Rafael).—1949. Preservación de microorganismos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** V: 395-410. E. N. S.

1.660
PEREZ GALLARDO (F.), CLAVERO (G.) y HERNANDEZ FERNANDEZ (S.).—1949. Hallazgo en España de la Rickettsia burneti, agente atiológico de la fiebre «Q». **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 489-496. E. N. S.

1.661
NAJERA (Luis).—1949. Sobre la investigación negativa de bacilos ácido-alcohol-resistentes en el exudado nasal en enfermos tuberculosos. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** VI: 539-544. E. N. S.

1.662
REMLINGER (P.) y BAILLY (J.).—1949. Ensayo sobre una nueva teoría patogénica de la rabia. **Revista de Sanidad e Higiene Pública.** XI-XII: 829-831. E. N. S.

Fotocopias en Microfilm (Unidad = fotograma formato Leica, 24 × 36 mm.).

a) En rollo de cinta continua.

b) En filmofichas.

La modalidad «filmoficha», por la gran facilidad de ordenación, archivación, localización rápida de las cintas y manejo de lectura, supera con mucho a la modalidad en rollo. Se llama «filmoficha» una tira de película de cinco fotogramas y medio (en otros sistemas seis), en que caben diez páginas de libro ordinario (libro abierto, o sea, dos páginas cada foto). El medio fotograma que se añade (uno entero en otros sistemas) se destina a «referencia», es decir, título y signatura en la filmoteca y en el centro de origen. Las filmofichas, para ofrecer tales ventajas, van alojadas en unas carpetas «Filmoteca», especialmente dispuestas para contener diez de ellas (cien páginas o cincuenta folios) en lóculos perfectamente adaptados con sus referencias numéricas y espacio preciso para títulos, páginas y toda clase de indicaciones útiles.

Fotocopias en papel.

En positivo; a diversos tamaños; se sirve juntamente el negativo en película, sin aumento de precio, si se pide.

Precios:

En microfilm: 50 céntimos por fotograma. Mínimo pagable: 2,50 pesetas (una filmoficha).

Carpeta «Filmoteca»: 2 ptas. Para cien páginas.

En papel: tamaño 9 × 12 cms., 2 ptas.; 13 × 18 cms., 2,50 ptas.; 18 × 24 cms., 3 ó 4 ptas., según el papel. Tamaños mayores, precios a convenir en cada caso.

SOCIEDAD DE MICROBIÓLOGOS ESPAÑOLES

JUNTA DIRECTIVA

Presidente	*D. Juan Marcilla Arrazola.*
Vicepresidente	*D. Gerardo Clavero del Campo.*
Secretario	*D. Lorenzo Vilas López.*
Bibliotecario	*D. Ricardo Salaya León.*
Tesorero	*D. Miguel Benlloch Martínez.*
Vocal de Bacteriología	*D. Valentín Matilla Gómez.*
" *de Inmunología*	*D. José García Bengoa.*
" *de Micología*	*D. José de Benito Martínez.*
" *de Protozoología*	*D. Luis Nájera Angulo.*
" *de Viriología*	*D. Eduardo Gallardo Martínez.*
" *de Microbiología Sistemática.*	*D. Arnaldo Socías Amorós.*
" *de Microbiología Aplicada* ..	*D. Rafael Ibáñez González.*
" *de Microbiología Patológica* .	*D. Pedro Carda Gómez.*

PRECIO: 22 PESETAS